

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO  
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

STUDIUM BIOAKUMULACE VYBRANÝCH KOVŮ

VODNÍM MECHOROSTEM FONTINALIS ANTIPYRETICA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

LENKA JASKOWIECOVÁ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY  
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF  
ENVIRONMENTAL PROTECTION

# STUDIUM BIOAKUMULACE VYBRANÝCH KOVŮ VODNÍM MECHOROSTEM FONTINALIS ANTIPYRETICA

STUDY OF METALS BIOACCUMULATION BY THE AQUATIC MOSS FONTINALIS  
ANTIPYRETICA

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

LENKA JASKOWIECOVÁ

VEDOUcí PRÁCE  
SUPERVISOR

Ing. PAVEL DIVIŠ, Ph.D.

BRNO 2008



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce

**FCH-DIP0237/2007**

Akademický rok: **2007/2008**

Ústav

Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí

Student(ka)

**Jaskowiecová Lenka**

Studijní program

Chemie a technologie ochrany životního prostředí (M2805)

Studijní obor

Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)

Vedoucí diplomové práce

**Ing. Pavel Diviš, Ph.D.**

Konzultanti diplomové práce

### Název diplomové práce:

Studium bioakumulace vybraných kovů  
vodním mechorostem *Fontinalis antipyretica*

### Zadání diplomové práce:

Stanovení rychlostních konstant akumulace a uvolňování kovů pro mechorost *Fontinalis antipyretica*, stanovení intra a extracelulární volné a vázané frakce kovů v mechorostu *Fontinalis antipyretica*, stanovení celkové koncentrace kovů, celkové rozpuštěné koncentrace kovů a stanovení koncentrace kineticky labilních forem kovů v modelovém systému přírodních vod

### Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

---

Lenka Jaskowiecová  
student(ka)

---

Ing. Pavel Diviš, Ph.D.  
Vedoucí práce

---

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

---

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá studiem procesů akumulace a detoxikace kadmia vodním mechorostem *Fontinalis antipyretica* a porovnáním techniky mechu *Fontinalis antipyretica* v perforovaných vacích s ostatními technikami ke stanovení (bio)dostupných forem kadmia v přírodních vodách. V laboratorních podmínkách byly realizovány 6denní testy, rozdělené na 3denní akumulační část a 3denní detoxikační část. V modelových roztocích obsahující čisté kultivační médium s přidanou koncentrací kadmia 50 a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  byla stanovena hodnota akumulační konstanty kadmia mechorostem *Fontinalis antipyretica*  $10,8 \pm 0,5 \text{ den}^{-1}$  a hodnota detoxikační konstanty  $0,28 \pm 0,04 \text{ den}^{-1}$ . Při 28denní expozici vodního mechorostu *Fontinalis antipyretica* v reálném systému řeky Moravy, byla nalezena pozitivní korelace celkové rozpuštěné koncentrace kadmia a (bio)dostupné koncentrace kadmia, zatímco koncentrace kadmia získané technikou difúzního gradientu v tenkém filmu byly až o dva řády nižší.

## ABSTRACT

This diploma thesis is focused on study of cadmium accumulation and detoxication processes by aquatic moss *Fontinalis antipyretica* and on comparing of the *Fontinalis antipyretica* moss-bags technique with another techniques for determination of bioavailable cadmium fractions in natural waters. In laboratory conditions were realized 6 days tests, divided into 3 days of accumulation and 3 days of detoxication. In model solutions contain only cultivation medium with added concentration of cadmium 50 a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  the value of accumulation constant of cadmium for aquatic moss *Fontinalis antipyretica*  $10,8 \pm 0,5 \text{ day}^{-1}$  and the value of release constant  $0,28 \pm 0,04 \text{ day}^{-1}$  was determinated. During the 28 days exposition of aquatic moss *Fontinalis antipyretica* in real system of Morava river positive correlation of dissolved cadmium concentration and bioavailable cadmium concentration was found. On the other hand the concentrations determined by the diffusive gradient in thin films technique were up to two orders lower.

## KLÍČOVÁ SLOVA

*Fontinalis antipyretica*, bioakumulace, AAS, DGT, kadmium, vodní mech.

## KEYWORDS

*Fontinalis antipyretica*, bioaccumulation, AAS, DGT, cadmium, aquatic moss.



JASKOWIECOVÁ, L. *Studium bioakumulace vybraných kovů vodním mechorostem Fontinalis antipyretica*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 46s. Vedoucí diplomové práce Ing. Pavel Diviš, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Tato práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

### *Poděkování:*

*Tímto děkuji všem, kteří mi pomohli s realizací mé diplomové práce. Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D. za vzorné vedení diplomové práce, Ing. Lukáši Brulíkovi za poskytnutí cenných rad, Romanu Szkanderovi za pomoc při technickém provedení práce a všem blízkým za velkou podporu.*

# OBSAH

<b>1. Úvod.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Teoretická část .....</b>	<b>8</b>
2.1 Kadmium v životním prostředí .....	8
2.1.1 Zdroje kadmia .....	8
2.1.2 Formy výskytu kadmia ve vodách.....	8
2.1.3 Toxicita kadmia .....	9
2.1.4 Bioakumulace kadmia .....	9
2.2 Stanovení kadmia ve vodě.....	10
2.2.1 Stanovení celkové koncentrace kadmia .....	10
2.2.1.1 Atomová absorpční spektrometrie.....	10
2.2.2 Stanovení (bio)dostupné koncentrace kadmia .....	11
2.2.2.1 Technika difúzního gradientu v tenkém filmu .....	11
2.3 Biodostupnost kovů .....	15
2.3.1 Pojem biodostupnost .....	15
2.3.2 Biodostupnost těžkých kovů .....	15
2.3.3 Faktory ovlivňující rozdělení kovů.....	16
2.3.3.1 Hodnota pH.....	16
2.3.3.2 Velikost částic .....	16
2.3.3.3 Teplota.....	16
2.3.4 Příjem kovů vodními organismy.....	17
2.4 Vodní organismy jako nástroje biomonitoringu .....	18
2.4.1 Pojem biomonitoring a bioindikátor.....	18
2.4.2 Vodní mech jako vhodný bioindikátor .....	18
2.4.3 Fontinalis Antipyretica Hedw. ....	19
2.4.3.1 Výskyt a rozšíření.....	19
2.4.3.2 Morfologické vlastnosti.....	19
2.4.3.3 Optimální podmínky kultivace.....	19
2.4.4 Způsob akumulace těžkých kovů ve Fontinalis antipyretica .....	21
<b>3. Experimentální část .....</b>	<b>23</b>
3.1 Použité chemikálie .....	23
3.2 Použité přístroje.....	23
3.2.1 Mikrovlnný laboratorní systém Milestone, MLS-1200 MEGA .....	24
3.2.2 AAS s atomizací v plameni.....	25
3.2.3 AAS s elektrotermickou atomizací.....	26
3.3 Pracovní postupy .....	28
3.3.1 Modelový systém.....	28
3.3.1.1 Odběr vzorku mechu.....	28
3.3.1.2 Ultrasonické čištění kombinované s ošetřením jódem .....	29
3.3.1.3 Kultivace mechu v laboratoři .....	29
3.3.1.4 Studium akumulace a detoxikace kadmia mechem Fontinalis antipyretica .....	29
3.3.1.5 Úprava vzorku mechu pro stanovení intra a extracelulární frakce kovů .....	29
3.3.1.6 Úprava vzorku mechu pro stanovení celkové koncentrace kovů.....	30
3.3.1.7 Analýza upravených vzorků mechu a vody .....	31

3.3.2	Expozice v reálném systému.....	31
3.3.2.1	Příprava jednotek DGT a moss-bagů.....	31
3.3.2.2	Expozice jednotek DGT a moss-bagů v reálném systému.....	32
3.3.2.3	Úprava a analýza jednotek DGT a moss-bagů po expozici.....	33
<b>4.</b>	<b>Výsledky a diskuze .....</b>	<b>34</b>
4.1	Obsah kadmia v mechorostu Fontinalis antipyretica .....	34
4.2	Experimenty v modelovém systému .....	34
4.2.1	Akumulační experiment .....	35
4.2.2	Detoxikační experiment .....	36
4.2.3	Stanovení intra a extracelulární koncentrace kadmia .....	36
4.3	Reálný systém.....	38
<b>5.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>39</b>
<b>6.</b>	<b>Seznam použitých zdrojů .....</b>	<b>40</b>
<b>7.</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>42</b>
7.1	Seznam použitých zkratk .....	42
7.2	Seznam použitých symbolů .....	44
<b>8.</b>	<b>Přílohy.....</b>	<b>45</b>
8.1	Lokalita odběru mechu .....	45
8.2	Vzorkování na řece Moravě .....	45

## 1. ÚVOD

Zvyšování koncentrace kovů v životním prostředí člověka (v ovzduší, vodě a půdě) je vážným problémem, jehož rozsah neustále vzrůstá. Činnost bakterií způsobuje, že organické látky kontaminující životní prostředí podléhají dříve či později chemickému rozkladu. Naproti tomu kovy chemické degradaci nepodléhají a hromadí se v prostředí. Půdní mikroorganismy i vodní mikroflóra dokonce způsobují, že část toxických kovů vstupuje do vazby s organickými látkami, čímž se v řadě případů znásobuje nebo významně mění jejich toxicita [1]. Pokud má dojít k jakémukoli zlepšení, je třeba zvládnout problémy analýzy životního prostředí. I když analytická kontrola sama o sobě nemůže přinést snížení kontaminace, je výchozím bodem pro jakékoli rozhodnutí nebo opatření. Pouze spolehlivé analytické výsledky mohou říci, jak pokračuje vývoj znečištění, kam jsou škodliviny transportovány, jak se projevilo zavedení nových detoxikačních technologií [2].

Měření koncentrace rozpuštěných forem kovů kovu běžně používanými analytickými technikami ovšem představuje jisté problémy. Koncentrace rozpuštěných kovů jsou obvykle velmi nízké, často na hranici limitu detekce, a proto je důležitá prekoncentrace vzorku, což pracovní postup komplikuje a přináší riziko vzniku dalších chyb. Pro přesné určení stupně kontaminace prostředí kovy je dále nutné znát data, vhodná pro porovnání časových změn, neboť koncentrace rozpuštěného kovu se mění značně s časem, ročním obdobím, atd. Také je třeba brát v úvahu, že běžně používané analytické techniky pro stanovení koncentrace rozpuštěného kovu poskytují pouze odhad o množství potenciálně toxické frakce kovů, ale ne o reálně dosažitelné, biodostupné frakci kovů. Proto jsou v současnosti nejvíce používány metody aktivního biomonitoringu, vycházející ze skutečnosti, že efekt kontaminantu nezávisí pouze na jeho koncentraci a toxicitě, ale také na jeho biodostupnosti a biologické aktivitě. Biodostupnost látky pro určitý druh organismu závisí na sérii fyzikálněchemických faktorů, i z tohoto důvodu měření celkové rozpuštěné frakce kovů v životním prostředí neposkytuje informace o tom, jak daný kontaminant ovlivňuje celý biologický systém. Bioindikátory jsou tak esenciálními nástroji pro hodnocení a monitoring kvality životního prostředí [3, 4].

V této diplomové práci je jako bioindikátor použit vodní mech *Fontinalis antipyretica*, ve spojení s *in situ* technikou difúzního gradientu (DGT), která poskytuje cenné informace o měření biodostupných forem kovů. Práce se věnuje stanovení biodostupných forem kadmia v přírodních vodách a je rozdělena do dvou částí, které tvoří laboratorní experimenty v modelovém roztoku a experimenty v reálném systému přírodních vod. Během laboratorních experimentů byly stanoveny konstanty akumulace a detoxikace kadmia mechorostem *Fontinalis antipyretica*. V experimentu prováděném na řece Moravě byl následně tento vodní mech použit ke stanovení biodostupných forem kadmia a technika mechu v perforovaných vacích byla porovnávána s ostatními metodami pro stanovení fyto toxických forem kovů.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kadmium v životním prostředí

#### 2.1.1 Zdroje kadmia

Téměř všechny kovy jsou ve stopových množstvích obsaženy přirozeně ve vodách a v dalších složkách životního prostředí. Ke značnému obohacení vodního ekosystému kovy může dojít v okolí rudných nalezišť. V tomto případě se jedná o přirozené pozadí a při nálezu zvýšené koncentrace kovů o přirozené znečištění. Naproti tomu znečištění přicházející do vod následkem činnosti člověka se nazývá antropogenní. Významnými zdroji antropogenního znečištění systémů povrchových vod jsou právě kovy [5].

Významným antropogenním zdrojem kadmia jsou fosforečnanová hnojiva a aplikace čistírenských kalů, které mohou obsahovat někdy i přes 1g kadmia v 1kg sušiny. Dalším zdrojem jsou odpadní vody z galvanického pokovování. Kadmium je součástí některých pigmentů a slouží jako stabilizátor některých termoplastů (např. PVC). Při spalování těchto plastových odpadů přechází pak kadmium do atmosféry, kde se významně podílí na její kontaminaci a následnou suchou depozicí se hromadí v půdě a ve vodních ekosystémech a to především v sedimentech na dně vodních nádrží [1, 6].

#### 2.1.2 Formy výskytu kadmia ve vodách

K obohacení vody kovy dochází stykem s horninami a půdou (sedimenty dna). Množství kovů ve vodě závisí jednak na imobilizačních procesech (srážení při zvýšení hodnoty pH a za oxidačních podmínek, adsorpce na nerozpuštěných látkách a sedimentech, inkorporace do biomasy vodních organismů), a jednak na procesech demobilizačních (rozpuštění při snížení hodnoty pH a za redukčních podmínek, desorpce, uvolňování z odumřelé biomasy). Vliv těchto podmínek na kumulaci a uvolňování kovů ze sedimentů však není zcela jednoznačný. Závisí na druhu kovu a na tom, v jaké chemické formě je kov ve vodě přítomen [5].

Kadmium se vyskytuje převážně ve formě jednoduchého iontu, hydroxokomplexu, karbonatokomplexu a případně i sulfatokomplexu  $[\text{CdSO}_4(\text{aq})]^0$ . V mořské vodě přicházejí v úvahu i chlorokomplexy, především  $[\text{CdCl}_2(\text{aq})]^0$ . Z organických komplexů jde především o komplexy s huminovými látkami. Ze stejných důvodů jako u zinku může za určitých podmínek jednoduchý kation  $\text{Cd}^{2+}$  patřit spolu s  $[\text{CdCO}_3(\text{aq})]^0$  a  $[\text{Cd}(\text{OH})_2(\text{aq})]^0$  mezi dominující formy výskytu kadmia ve vodě.

Posuzování rozpustnosti kadmia v různých typech vod je analogické jako u zinku. Chybí však údaje o hydroxid-uhličitanu kademnatém, takže se při posuzování rozpustnosti bere v úvahu jen  $\text{CdCO}_3$  (s) a  $\text{Cd}(\text{OH})_2$  (s). Rozpustnost  $\text{CdCO}_3$  (s) je menší než rozpustnost  $\text{Cd}(\text{OH})_2$  (s). V anaerobních podmínkách za přítomnosti sulfidické síry se může z vody vylučovat i  $\text{CdS}$  (s), naproti tomu křemičitan kademnatý je rozpustnější než zinečnatý, takže zpravidla rozpustnost kadmia v přírodních vodách neovlivňuje [6].

Koncentrace rozpuštěného kadmia v přírodních vodách může do značné míry ovlivnit procesy adsorpce a desorpce kadmia na sedimentech, jejichž sorpční mohutnost závisí na obsahu huminových látek. Hodnota koncentračního koeficientu je u reálné koncentrace kadmia ve vodě obvykle nižší než rovnovážné koncentrace vypočtené ze součinů rozpustnosti, i když se berou v úvahu vedlejší reakce ovlivňující rozpustnost [6].

### **2.1.3 Toxicita kadmia**

Kadmium není pro živé organismy esenciálním prvkem, naopak patří mezi velmi nebezpečné jedy. Mezi kovy se v řadě podle klesající toxicity nachází na druhém místě hned za rtutí. Značně se kumuluje v biomase, má jeden z nejvyšších koncentračních koeficientů. Setrvává velmi dlouho v těle, protože na rozdíl od rtuti netvoří biochemickou cestou těkavé alkylderiváty. Kromě toho zesiluje toxické účinky jiných kovů, např. zinku a mědi (synergismus). Stejně jako zinek je i kadmium značně toxické pro vodní organismy. Za přirozené pozadí ve vodách ČR se považuje koncentrace kadmia do  $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Podle U.S.EPA je hodnota dlouhodobé koncentrace kadmia bez negativních vlivů na vodní ekosystém  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  [2, 6].

Mechanismus toxického působení kadmia na vodní živočichy spočívá převážně ve vazbě kovu na aminokyseliny a SH-skupiny bílkovin, působí tak jako enzymové jedy. V biologických systémech má kadmium schopnost vytěsňovat zinek a interferovat s jeho vnitrobuněčnou funkcí. Při nižším zatížení organismu působí kadmium hypertenzi. Při větší akumulaci, kdy se již uplatňuje toxicky, není hypertenze příliš běžná.

Toxicita kadmia je výrazně ovlivněna formou výskytu ve vodě. Anorganické a organické nerozpustné nebo méně rozpustné komplexy jsou zpravidla méně toxické než jednoduché ionty [2, 7].

### **2.1.4 Bioakumulace kadmia**

Vzhledem ke svým chemickým vlastnostem kadmium snadno reaguje s celou řadou biologicky aktivních molekul, včetně proteinů, fosfolipidů, purinů, porfyrinů, nukleových kyselin a enzymů. Kadmium snadno nahrazuje zinek v některých enzymech. Tato záměna kovů může pak působit sníženou nebo zvýšenou aktivitu enzymů. Intracelulární působení kadmia je podmíněno jeho schopností proniknout buněčnou membránou. Kation kadmia reaguje snadno s membránovými fosfolipidy, má větší afinitu než vápník. Prokázalo se, že interakce kadmia s biomembránami je v podstatě mechanismem akutní otravy organismu kadmиеm [8].

## 2.2 Stanovení kadmia ve vodě

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.1.3, toxicita kadmia značně závisí na chemické formě výskytu. Pro stanovení různých forem kovů byl v analytické chemii zaveden pojem speciální a frakcionační analýza. Speciální analýza kovů dle IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) označuje analytický postup separace a stanovení jedné nebo více individuálních forem kovů. Pojem frakcionace v sobě zahrnuje různé analytické postupy zaměřené na stanovení různých skupin (frakcí) chemických forem kov na základě jejich fyzikálních (struktura, rozměr) a chemických (chemická vazby, typ vazby, stabilita) vlastností.

### 2.2.1 Stanovení celkové koncentrace kadmia

Ke stanovení celkové koncentrace kadmia ve vzorcích vod se nejčastěji používá technika AAS případně ICP-MS. Tyto techniky lze využít i pro stanovení celkové rozpuštěné koncentrace kadmia. V tomto případě se vzorek ihned po odběru filtruje přes 0,45  $\mu\text{m}$  filtr.

#### 2.2.1.1 Atomová absorpční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie je jednou z nejrozšířenějších metod stopové prvkové analýzy, jednak pro vysokou citlivost stanovení, a jednak pro nízké pořizovací a provozní náklady. Umožňuje stanovení více než 60 prvků v koncentracích od jednotek  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  až po několik desetin  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Základem metod atomové absorpční spektrometrie je proces absorpce specifického fotonu a přechod valenčního elektronu na vyšší energetický stav. V atomové absorpční spektrometrii se měřicí systém skládá ze tří hlavních komponent: zdroje primárního specifického záření, atomizátoru obsahujícího volné atomy a zařízení pro selektivní měření neabsorbovaného záření (detektor, výpočetní systém) [9].

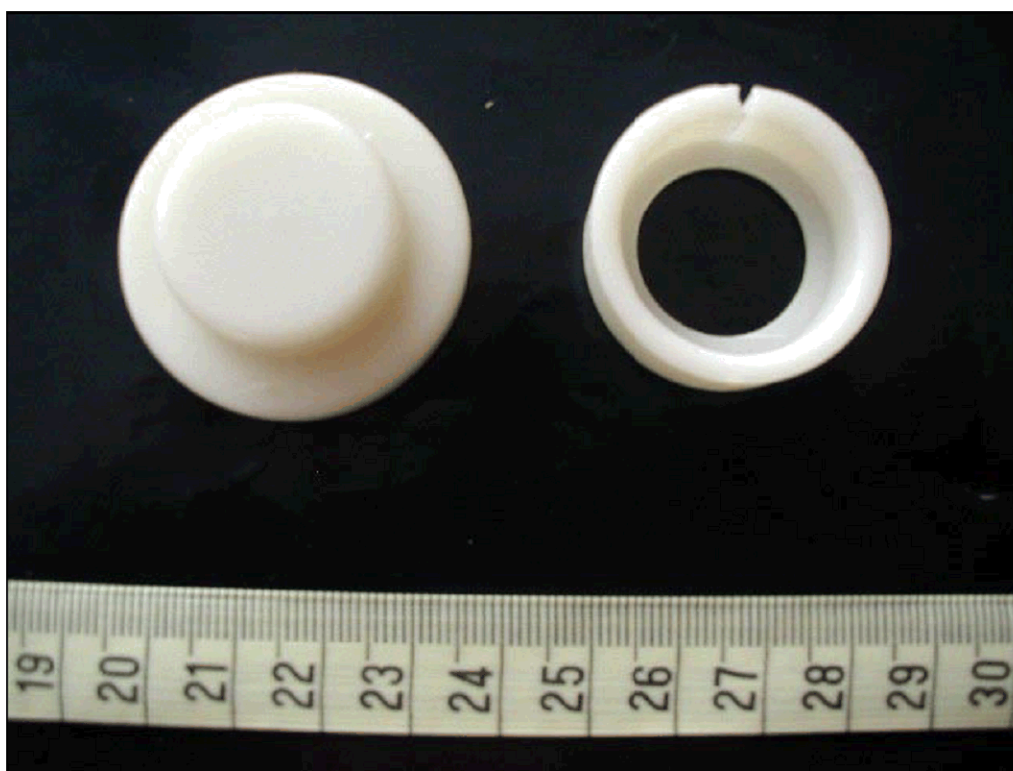
Ke stanovení celkového kadmia ve vzorcích vod se nejčastěji používá právě této metody. Velmi nízké koncentrace, ovšem při větší spotřebě objemu vzorku, umožňuje atomová absorpční spektrometrie s atomizací plamenem (FA). Jedná se o nejstarší atomizační techniku, jejíž principem je převedení roztoku na aerosol ve zmlžovači a zavádění tohoto aerosolu do laminárního předmíchávaného plamene. Protože však plamenová AAS nedosahuje citlivostí, které by byly dostačující pro řešení řady analytických problémů (analýza životního prostředí, analýza čistých chemikálií), byly hledány nové způsoby atomizace. Jednou z možností je atomizace vzorku v elektrotermickém atomizátoru (ETA). Toto jsou zařízení vyhřívaná na potřebnou teplotu pomocí elektrického proudu, a to buď vlivem vloženého napětí, opačných elektrických nábojů, eventuálně může být použito indukce elektromagnetického pole. Výhodou elektrotermické atomizace je možnost stanovení velice nízkých koncentrací při použití podstatně nižších nárocích na objem vzorku [2, 9, 10].

## 2.2.2 Stanovení (bio)dostupné koncentrace kadmia

Výzkum během posledních dvaceti let ukázal, že měření celkové a celkové rozpuštěné koncentrace kovů nemusí zcela informovat o jejich fyziologických účincích. Na základě mnoha pokusů byl do vědecké praxe zaveden model FIAM (Free Ion Activity Model) označující za nejvíce toxickou frakci kovů – frakci volných kovových iontů a iontů vázaných v kineticky labilních komplexech. Pro stanovení těchto forem kovů lze využít techniky ASV, nebo různých pasivních vzorkovačů, v čele s technikou DGT. Nejužitečnější informace lze však získat pomocí tzv. biomonitorovacích metod [11].

### 2.2.2.1 Technika difúzního gradientu v tenkém filmu

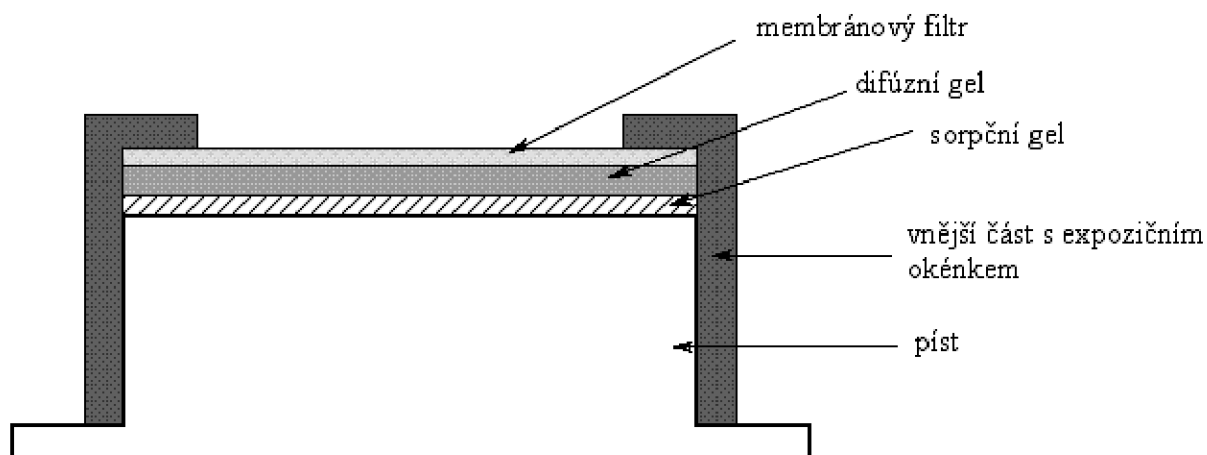
Technika difúzního gradientu v tenkém filmu (DGT) je založena na vytvoření koncentračního gradientu v tenké vrstvě polyakrylamidového gelu a difúzi iontů z vnějšího roztoku do jednotky DGT. Jedná se o *in situ* techniku zaměřenou na vzorkování kovů v přírodních vodních ekosystémech. Výhodou je velmi snadná manipulace a jednoduchost použití plastových vzorkovacích jednotek DGT (Obr. 1). Vysoká citlivost metody a schopnost prekoncentrace vzorku umožňuje měření velmi nízkých koncentrací, které jsou pro běžně používané metody pod mezí detekce [12-14].



Obr.1: Vzorkovací jednotka pro měření *in situ* ve vodách a v půdách technikou DGT. Převzato z [15].

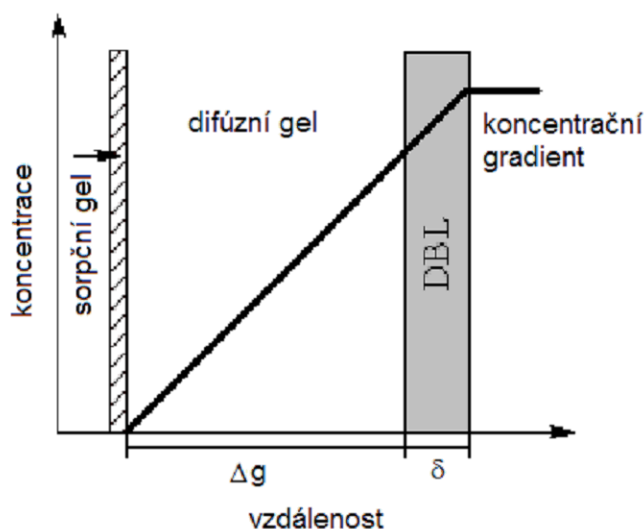


Plastová vzorkovací jednotka DGT má tvar pístu (Obr. 2). Na píst se pokládá vrstva polyakrylamidového gelu se zakotveným iontoměničem (nejčastěji Chelex 100), tzv. sorpční gel. Ten je překryt vrstvou difúzního gelu, jehož tloušťka je přesně definována. Vrchní vrstvu tvoří membránový filtr o velikosti póru  $0,45\ \mu\text{m}$ , který zabraňuje mechanickému poškození vrstev gelu během expozice v reálném přírodním ekosystému. Difúzní gel a membránový filtr společně tvoří difúzní vrstvu  $\Delta g$ .



Obr.2: Uložení gelů ve vzorkovací jednotce DGT. Převzato a upraveno z [16].

Technika DGT měří ty kovové specie, které jsou schopny difúze v difúzním gelu a ty kovové specie, které jsou schopny vazby na iontoměnič Chelex 100, tedy jednoduché kovové ionty, hydratované ionty a jejich slabé komplexy. Jednotka DGT akumuluje kovové specie tak dlouho, dokud nedojde k vyčerpání kapacity iontoměniče, což je pro uvedené uspořádání a aplikaci jednotky DGT v přírodních systémech až po dobu několika měsíců [12, 15-17].



Obr. 3: Schématické znázornění koncentračního gradientu ve vzorkovací jednotce DGT. Převzato a upraveno z [17].

Při expozici jednotek DGT v roztoku se v difúzním gelu během několika minut ustanoví lineární koncentrační gradient (Obr. 3), tok iontů kovů  $F$  ( $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) skrz difúzní vrstvu se řídí:

I. Fickovým zákonem difúze

$$F = D \frac{dC}{dx}, \quad (1)$$

kde  $D$  je difúzní koeficient ( $\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ) a  $\frac{dC}{dx}$  je koncentrační gradient ( $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-4}$ ).

Na rozhraní vnějšího roztoku a difúzního gelu se nachází difúzní hraniční vrstva (DBL) o tloušťce  $\delta$ , která má význam u roztoků, které nejsou dostatečně míchány. Tok chemických forem kovů potom nabývá tvar

$$F = D \frac{(C_{DGT} - C')}{(\Delta g + \delta)}, \quad (2)$$

kde  $C_{DGT}$  je koncentrace chemických forem kovů ve vnějším roztoku ( $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ ),  $C'$  je koncentrace chemických forem kovů na rozhraní sorpčního a difúzního gelu ( $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ ),  $\Delta g$  je tloušťka difúzní vrstvy (cm) a  $\delta$  je tloušťka difúzní hraniční vrstvy (cm).

Za podmínky rychlého navázání chemických forem kovů na sorbent je koncentrace  $C'$  rovna nule. Pokud je roztok dostatečně míchán, je tloušťka difúzní hraniční vrstvy  $\delta$  velmi malá oproti tloušťce difúzní vrstvy, proto ji lze zanedbat a vztah (2) se zjednoduší:

$$F = \frac{DC_{DGT}}{\Delta g}. \quad (3)$$

Hmotnostní tok chemických forem kovů se definuje jako množství  $M$  (g), které prošlo plochou exponované části gelu  $A$  ( $\text{cm}^2$ ) za čas  $t$  (s):

$$F = \frac{M}{At_{DGT}}. \quad (4)$$

Množství kineticky labilních forem kovů navázaných v sorpčním gelu popisuje vztah:

$$M = \frac{C_e(V_g + V_e)}{f_e}, \quad (5)$$

kde  $C_e$  je koncentrace chemických forem kovů v eluátu ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ),  $V_g$  je objem sorpčního gelu ( $\text{cm}^3$ ),  $V_e$  je objem roztoku  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  kyseliny dusičné ( $\text{cm}^3$ ),  $f_e$  je eluční faktor, udávající množství chemických forem kovů vyluhovaných v jednom elučním kroku z celkového sorbovaného množství [12, 15-17].

Sloučení rovnic (3) a (4) nabízí vztah pro výpočet koncentrace v měřeném roztoku:

$$C_{DGT} = \frac{M\Delta g}{Dt_{DGT}A}, \quad (6)$$

kde  $M$  je množství kineticky labilních forem kovů sorbovaných v sorpčním gelu (g),  $D$  je hodnota difúzního gradientu při teplotě měření ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $t_{DGT}$  čas expozice pistonu v měřeném roztoku (s) a konečně  $A$  je plocha exponované části gelu ( $\text{cm}^2$ ) [12, 15-17].

Jak již bylo zmíněno, pro biotu jsou nejvíce toxické kineticky labilní formy kovů. Studie porovnávající techniku DGT s ASV měřením a různými kinetickými modely potvrdily, že technika DGT měří právě tyto frakce kovů. Z tohoto důvodu je měřená frakce kovů technikou DGT označována za (bio)dostupnou, ačkoliv přímá souvislost s DGT měřenou frakcí kovů a s množstvím naakumulovaného množství kovů v biotě nebyla do této doby plně prokázána [11, 18-20].

## **2.3 Biodostupnost kovů**

### **2.3.1 Pojem biodostupnost**

Biodostupnost je charakterizována jako schopnost látky (v tomto případě kovu) být přijímána organismem z okolního prostředí, kterým může být voda, vzduch, sediment, půda nebo potrava. Biodostupnost je funkcí vlastností dané chemické látky (např. rozpustnost ve vodě, tenze par, polarita, molekulová hmotnost, forma výskytu) a fyzikálních a chemických parametrů daného prostředí, ve kterém se látka nachází (např. teplota, pH, obsah kyslíku a uhlíku, vlhkost) [21].

### **2.3.2 Biodostupnost těžkých kovů**

Kovy, které jsou v hlavním zájmu z hlediska biodostupnosti podle U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) jsou Al, As, Be, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, S a Sb. Studium biodostupnosti těchto kovů však není v současnosti věnována dostatečná pozornost. Tyto kovy byly vybrány podle možnosti mít vliv na člověka a způsobovat zvýšené zdravotní riziko.

Kovy mohou být rozptýleny v půdě, vodě a vzduchu. V centru pozornosti jsou převážně biodostupné formy kovů rozptýlených v půdách a sedimentech, rozpuštěných v podzemních a povrchových vodách, suspendovaných jako částice v povrchových vodách a pórových vodách sedimentu (Obr. 4). Do atmosféry mohou být kovy rozptýleny jak přirozenými geochemickými cykly, tak antropogenními zdroji a mikrobiální činností. Tyto cykly kovů v přírodě musí být uváženy při studiu jejich biodostupnosti. Bioakumulace kovů biotou v povrchových vodách a rostlinami a zvířaty v pozemských systémech, může nepříznivě působit na člověka [22].

V povrchových a podzemních vodách, v sedimentech a v ovzduší je biodostupnost kovů složitou funkcí mnoha proměnných, včetně koncentrace, mineralogie, pH, redox potenciálu, teploty, celkového obsahu organických látek (jak částice, tak i rozpuštěné frakce), obsahu suspendovaných částic, stejně jako objemu vody, proudu vody a trvání dostupnosti vody, zvláště ve vyprahlých a polosuchých oblastech. Mnoho z těchto faktorů se mění sezónně a časově a většina z nich se navzájem ovlivňuje. V důsledku toho může jeden proměnný faktor ovlivnit řadu dalších. Navíc většina faktorů má velký vliv na bioakumulaci kovů a zabráňují tak předpokládat biodostupnost kovů [23].

### 2.3.3 Faktory ovlivňující rozdělení kovů

Ještě před tím, než jsou kovy, obsažené ve vodním prostředí, přijaty organismy, jsou rozděleny mezi pevnou a kapalnou fází. V obou těchto fázích se pak dále rozdělují mezi přírodní ligandy, na což má vliv koncentrace těchto ligandů a síla vazby kov-ligand. Ve všech fázích, rozptýlené jemné částice a rozpuštěné formy kovů, mohou být rozděleny do šesti frakcí: (a) rozpuštěné, (b) vyměnitelné, (c) uhličitanové, (d) Fe-Mn oxidy, (e) organické a (f) krystalické. Rozdělení kovů mezi tyto frakce je silně ovlivněno změnami pH, redukčních stavů, obsahu organické hmoty a dalších činitelů vyskytujících se v prostředí. Rozpuštěná frakce je převážně tvořena uhličitanovými komplexy, jejichž nadbytek roste se zvyšujícím se pH a obsahem kovu v prostředí, včetně kationtu kovů, aniontového komplexu a hydratovaného iontu, jehož rozpustnost je ve vodě ovlivněna hodnotou pH a má sklon růst s klesajícím pH. Vyměnitelné frakce jsou tvořeny kovy navázanými na koloidní částice. Frakce Fe-Mn oxidů se skládá z kovů adsorbovaných v povlaku Fe-Mn oxidů na povrchu částic. Frakce kovů vázaných na organickou hmotu je tvořena kovy navázanými k různým formám organické hmoty. Krystalická fáze se skládá z kovů. Které jsou vázány v krystalové struktuře nerostů a tudíž normálně nejsou biotě k dispozici [24, 25].

#### 2.3.3.1 Hodnota pH

Aktivita vodíkového  $H^+$  iontu (pH) je pravděpodobně nejdůležitější faktor ovlivňující formy kovů ve vodách, rozpustnost z minerálů, transport kovu ve vodním sloupci a jejich možnou biodostupnost ve vodných roztocích. pH působí na obojí, jak na rozpustnost hydroxylových skupin kovů, tak na adsorpčně-desorpční procesy. Většina minerálů a hydroxidy kovů mají velmi malou rozpustnost při hodnotách pH, jaké mají přírodní vody. Rozpustnost kov-hydroxid minerálů vzroste s klesajícím pH a tak se větší množství kovů stává dosažitelným pro začlenění v biologických procesech. Hydratované ionty kovů jsou obvykle nejvíce toxickými formami pro vodní organismy. Adsorpce, která se vyskytuje, když jsou rozpuštěné kovy připojeny k povrchům částic hmoty (zejména minerálů oxidů železa, manganu a hliníku, jílu a organické hmoty), je také silně závislá na hodnotě pH a samozřejmě i na dostupnosti povrchu částic a celkového obsahu rozpuštěných kovů [25, 26].

#### 2.3.3.2 Velikost částic

Velikost částic a tím pádem také celková oblast povrchu dostupná pro adsorpci jsou také velice důležitými faktory v procesu adsorpce a mohou významně ovlivnit biodostupnost kovů. Malé částice s velkým aktivním povrchem dovolují větší stupeň adsorpce než stejná masa větších částic s menším aktivním povrchem. Redukovaná adsorpce může zvýšit biodostupnost kovů zvyšováním koncentrace rozpuštěných kovů ve vodě [23, 24].

#### 2.3.3.3 Teplota

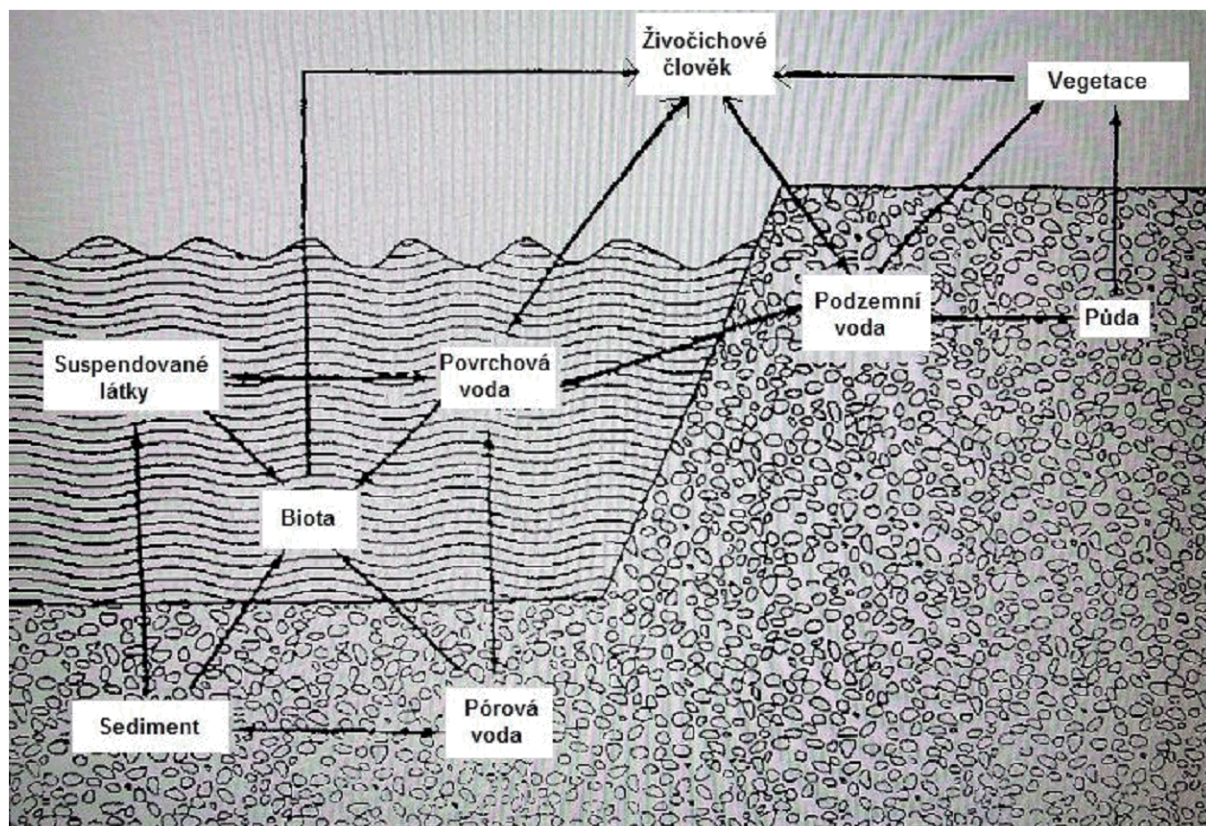
Dalším výrazným faktorem je teplota, která má vliv na to, v jakých formách se budou dané kovy ve vodním prostředí vyskytovat. Je to dáno tím, že většina chemických reakcí je velmi citlivá na teplotní změny. Nárůst teploty o  $10^{\circ}C$  může urychlit kineticky pomalé biochemické reakce, aby se dosáhlo co nejrychlejší rovnováhy systému. Teplota také ovlivňuje adsorpční procesy, tedy množství kovu přijatého organismem, protože s každým zvýšením teploty o  $10^{\circ}C$  se zdvojnásobují biologické procesy [22, 27].

### 2.3.4 Příjem kovů vodními organismy

Pro absorpci kovů vodními organismy existují dvě cesty: (1) přijímání potravy ze sedimentů obohaceném o kovy a suspendovaných částic během krmení a (2) příjem kovů z vodního prostředí povrchem těla.

Studie biodostupnosti kovů udávají, že vodní organismy absorbují volné hydratované ionty kovů z vodního sloupce velice účinně, podobně i suchozemská zvířata absorbují volné ionty kovů z příjmu tekutin mnohem účinněji než přes částice hmoty přijímané potravou. Následkem toho podmínky prostředí, které zvyšují množství rozpuštěných volných kovových iontů (například nižší pH), mají za výsledek větší biodostupnost těchto kovů organismy. Nepřímé regulování, jako velikost částic nebo množství sedimentu, také může vést k velké biodostupnosti kovů snižováním adsorpce a zvyšováním obsahu rozpuštěného kovu. Přijímání kovů potravou hraje důležitou roli, protože kovy v této formě bývají obvykle vysoce koncentrované. Účinnost bioakumulace přijímáním potravy přes sediment je velmi závislá na geochemických cyklech sedimentu.

Pro pochopení řídicích prvků biodostupnosti kovů v přírodních vodách je nezbytná znalost geochemických reakcí kovů ve vodě i v sedimentu. Bohužel mnoho biologických faktorů řízení bioakumulace dosud není prostudováno a tato skutečnost značně limituje znalost a pochopení biodostupnosti kovů [23].



Obr.4: Vzájemné vztahy mezi člověkem, kovy a životním prostředím.  
Převzato a upraveno z [22].

## **2.4 Vodní organismy jako nástroje biomonitoringu**

### **2.4.1 Pojem biomonitoring a bioindikátor**

Biomonitoring (sledování a hodnocení kvality vody pomocí biologických charakteristik) je dlouhodobé standardizované měření, pozorování a hodnocení životního prostředí s cílem definovat současný stav a trendy. Bývá organizován na rutinní bázi s dobře definovaným souborem sledovaných proměnných a standardizovanou metodikou. Kontrolní místa a frekvence odběru jsou fixní; hodnocení výsledků je standardizováno a jejich prezentace musí být ve schválené podobě. Hlavní důvody využití organismů pro monitoring vodního prostředí jsou: (1) organismy žijí v rovnováze se svým prostředím; úroveň jejich kontaminace odráží úroveň kontaminace prostředí a (2) monitoring poskytuje přímé informace o vlivu znečištění vodního prostředí na biocenózy, je schopen zachytit i kumulativní působení škodlivin.

Myšlenka, že určité druhy mohou být použity pro indikování určitých typů environmentálních podmínek, je dobře zavedená. Přítomnost druhu indikuje, že prostředí je pro něj vhodné a protože jsou známy nároky mnohých druhů na prostředí, jejich přítomnost vypovídá o charakteru prostředí, ve které byli nalezeni. Proto je tato koncepce přítomnosti druhu indikujícího určité podmínky (bioindikátorů), založená na praktickém pozorování, běžně rozšířená [28].

Spojení ekologických, fyziologických a chemicko-analytických problémů vyústilo ke vzniku takových oblastí studia jako je ekochemie, ekotoxikologie, ekologická biochemie a environmentální analýza. Bioindikace nebo biomonitoring je jedna z oblastí studia, která se vyvinula z interdisciplinárního pohledu. Termín bioindikátor znamená organismus (část organismu nebo společenstva organismů), který nám poskytuje informace o kvalitě jeho životního prostředí. Na druhou stranu biomonitor je organismus, který kvantifikuje kvalitu svého životního prostředí. V kontextu s oběma pojmy se jedná o organismus, který reaguje na změny podmínek prostředí měřitelnými změnami v průběhu života ve významu morfologickém nebo fyziologickou změnou metabolismu. Pasivní bioindikátory jsou organismy, které jsou přítomny ve studované oblasti. Aktivní bioindikátory jsou organismy, které jsou vystaveny ve studované oblasti po určitou definovanou dobu. Pro tyto účely se používají různé druhy měkkýšů, vodních rostlin a mečů [29].

### **2.4.2 Vodní mech jako vhodný bioindikátor**

Použití biologických informací se stává v poslední době velmi důležitým parametrem pro management kvality vody. Biologické indikátory se používají stále častěji jako doplněk fyzikálních a chemických parametrů, pro stanovení a monitoring kvality vod. Studium vodní vegetace nám poskytuje informace o kvalitě životního prostředí. Obzvláště pak široké rozšíření vodních mečů a jejich schopnost akumulovat kovy vedla k jejich použití v programech pro monitoring životního prostředí. Použití druhů z této skupiny usnadňuje hodnocení celkové kvality životního prostředí (na základě stupně stresu) a koncentrace jednotlivých kontaminantů (na základě analýzy pletiva) [30].



Aby byl organismus považován za „dobrý“ indikátor, musí splňovat celou řadu podmínek. Vodní mechy mají zaručené vlastnosti, které z nich dělají excelentní bioindikátory [30].

Vodní mechy vykazují velkou kapacitu k asimilaci těžkých kovů, což vede k tomu, že koncentrace uvnitř rostliny je několikrát vyšší než v okolním prostředí. Díky jejich fyziologické i ekologické charakteristice a také díky tomu, že jsou rozšířeny prakticky ve všech evropských řekách, byly vodní mechy úspěšně používány jako biologické indikátory znečištění povrchových vod těžkými kovy [31]. Jejich akumulární kapacita dovoluje sloučení náhodných výkyvů v koncentraci kovů ve vodách během dlouhého časového období. Vodní mechy tak dokázaly uspokojit základní požadavky pro dobrý bioindikátor a tak mohou být používány jako nízkonákladová metoda pro monitoring kvality vod [32].

### **2.4.3 Fontinalis Antipyretica Hedw.**

Rod: *Fontinalaceae*

Třída: *Fontinalis antipyretica Hedw.*

#### **2.4.3.1 Výskyt a rozšíření**

*Fontinalis* je jedním ze submerzních vodních mechů a je rozšířen v mírných oblastech severní polokoule. *Fontinalis* se nachází hlavně oligotrofických tocích se silným proudem vody, připojený k útesům, skalám nebo jen tak volně plovoucí na hladině. Vyskytuje se také připojený k substrátu ve stojatých vodách.

#### **2.4.3.2 Morfologické vlastnosti**

Mech roste v hustých chomáčích a jeho výhonky dosahují délky 50-60 cm. Stonky mají tvar trojúhelníku a jsou zcela pokryty listy, které mají délku až 9 mm, jsou neohebné, špičaté, vejcovité a ostře člunkovité. Bezkvětý mech produkuje výtrusy sloužící k rozmnožování, ale spíše se rozmnožuje pomocí výhonků a zlomků, které se znovu uchytí na podkladě. Výtrusy jsou v hladkých pouzdrech 2 - 2,6 mm dlouhých a rostlina je produkuje jen tehdy, jestliže je vystavena suchu nebo začíná být vysoušena. Mají nepravé kořeny, vlasové kořínky (rhisoidy), kterými se vodní mech uchytne k útesům, skalám nebo substrátu.

#### **2.4.3.3 Optimální podmínky kultivace**

Pro růst mechu je optimální teplota kolem 15°C, záleží na druhu mechu. Po delší době v teplejší vodě, např. po pěti týdnech ve vodě o teplotě 20°C, většina druhů zhnědne a jejich růst se zastaví. Tyto podmínky ale nejsou obvykle dostačující pro jejich odumření. Růst a veškerá aktivita mechu se obnoví, jakmile se vrátí do chladnějších podmínek. *Fontinalis antipyretica* se obecně vyskytuje v nepatrně kyselých vodách, kde je k dispozici rozpuštěný oxid uhličitý. *Fontinalis antipyretica* poskytuje přirozené prostředí pro vodní hmyz, larvy a další mikroorganismy, proto je důležité před odebráním mechu několikrát a důkladně rostlinu propláchnout říční vodou. Jako většina mechů je to dobrý akumulátor těžkých kovů a možná použitelný nejen ke studiu biodostupnosti těžkých kovů, ale i k odstraňování těžkých kovů z prostředí [33, 34].





Obr.5: *Fontinalis antipyretica*



Obr.6: *Fontinalis antipyretica* – detail listku. Převzato z [35].

#### 2.4.4 Způsob akumulace těžkých kovů ve *Fontinalis antipyretica*

Akumulace polutantů probíhá dvěma hlavními procesy – adsorpcí a absorpcí. Adsorpce probíhá rychle a skoro výlučně na buněčné stěně, kde se uskuteční výměna mezi kationy ve stěně a iontovými formami kovů [36]. Zde působí také elektrostatické vazby mezi skupina protonu na buněčné stěně a ionty kovů. Tyto procesy jsou vratné, to znamená, že stopové prvky by mohly být pomalu uvolněny z mechu zpět do vodního sloupce.

Absorpce souvisí s průnikem iontů kovů do buněk cytoplazmy mechu. Tento proces probíhá pomalu a dvěma způsoby, pasivní difúzí a aktivním transportem. Pomalu probíhající kationaktivní výměna na cytoplazmatické úrovni částečně závisí na metabolismu organismu. Kovy jsou v mechu kumulovány poměrně rychle, což má výhodu v kratší době expozice [28, 37].

Pro dvousložkový systém (voda-rostlina) je transfer iontů kovů z a do vodního mechu vyjádřen kinetickou rovnicí 1. řádu jako

$$C_v \xrightarrow{k_1} C_m - C_{m0}, \quad (7)$$

kde  $C_v$  je koncentrace kovu ve vodě ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ),  $C_m$  je koncentrace kovu v mechu ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ),  $C_{m0}$  je počáteční koncentrace kovu v mechu ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ),  $k_1$  je akumulací konstanta ( $\text{h}^{-1}$ ) a  $k_2$  je detoxikační konstanta ( $\text{h}^{-1}$ ).

Změna koncentrace kovu v mechu během doby příjmu je dána diferenciální rovnicí

$$\frac{dC_m}{dt} = k_1 \frac{C_v}{\rho} - k_2 (C_m - C_{m0}), \quad (8)$$

kde  $t$  je čas (h) a  $\rho$  je hustota vody ( $\text{kg}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

Integrací rovnice (8), s počátečními podmínkami  $C_m = C_{m0}$  v čase  $t = 0$  a předpokladem, že  $C_v = \text{konstanta}$ , dostaneme rovnici

$$C_m = C_{m0} + \frac{k_1 C_v}{k_2 \rho} (1 - e^{-k_2 t}). \quad (9)$$

Když  $t$  směřuje k nekonečnu, koncentrace kovu v mechu směřuje k rovnovážnému stavu ( $C_{me}$ ), pak

$$C_{me} = C_{m0} + \frac{k_1 C_v}{k_2 \rho}. \quad (10)$$

Nahrazením  $t$  za  $t_d$  ( $t_d$  = čas na konci doby příjmu) v rovnici (9), můžeme vypočítat koncentraci kovu na konci doby akumulace ( $C_{mu}$ ):

$$C_{mu} = C_{m0} + \frac{k_1 C_v}{k_2 \rho} (1 - e^{-k_2 t_d}). \quad (11)$$

Za ustálených podmínek může být bioakumulační faktor vyjádřený biokoncentračním faktorem (BCF) definovaným jako

$$BCF = \frac{(C_{me} - C_{m0})\rho}{C_v} = \frac{k_1}{k_2}. \quad (12)$$

Přerušením přidávání kovu do vody v čase  $t = t_d$  začíná dekontaminační doba. Experimentální studie ukázaly, že během této doby nedochází ke kompletní eliminaci kovu, jinak řečeno, hodnota naakumulovaného kovu je vyšší než počáteční hodnota kovu v rostlině. V této fázi se koncentrace kovů mění s časem podle rovnice:

$$\frac{dC_m}{dt} = -k_2 (C_m - C_{mz}), \quad (13)$$

kde  $C_{mz}$  je zbytková koncentrace kovu v mechu ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

Integrací rovnice (13) s počátečními podmínkami

$$t = t_d, \quad C_m = C_{mu} \quad (14)$$

dostaneme rovnici

$$C_m = C_{mz} + (C_{mu} - C_{mz})e^{-k_2(t-t_d)}. \quad (15)$$

Jestliže  $t$  se blíží nekonečnu a  $C_m$  se blíží  $C_{mz}$ , pak biologický eliminační faktor (BEF) může být definovaný pro dobu detoxikace:

$$BEF = \frac{C_{mu} - C_{mz}}{C_{mu}} = 1 - \frac{C_{mz}}{C_{mu}}. \quad (16)$$

BEF může nabývat hodnot mezi nulou (bez detoxikace, kdy nedochází k uvolnění kovu) a jedničkou (kompletní detoxikace, kdy dochází k uvolnění veškerého kovu) [38].

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité chemikálie

Veškeré použité chemikálie jsou uvedeny spolu s výrobcí v tabulce 1. Čistota chemikálií byla p.a. nebo vyšší.

Pro přípravu vodných roztoků byla použita ultračistá voda upravená přístrojem Milli-Q Academic firmy Millipore.

Tab.1: Použité chemikálie a jejich výrobci.

název chemikálie	výrobce
kyselina dusičná	PENTA, ČR
peroxid vodíku	Lach-Ner s r.o.
standardní roztok Cd	Analytika Co.Ltd., Praha
plyn v tlakové nádobě: Ar	Linde Technoplyn
chlorid nikelnatý	Lachema, ČR
dusičnan draselný	Lachema, ČR
dihydrát dusičnanu sodného	Lachema, ČR
heptahydrát síranu hořečnatého	Lachema, ČR
hydrogenuhličitan sodný	Lachema, ČR
dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema, ČR
jodid draselný	Lachema, ČR
jód	Lachema, ČR

Vodní mech *Fontinalis antipyretica* byl získán z lokality u obce Hynkov (viz. Kap. 4.3.1.1.).

#### 3.2 Použité přístroje

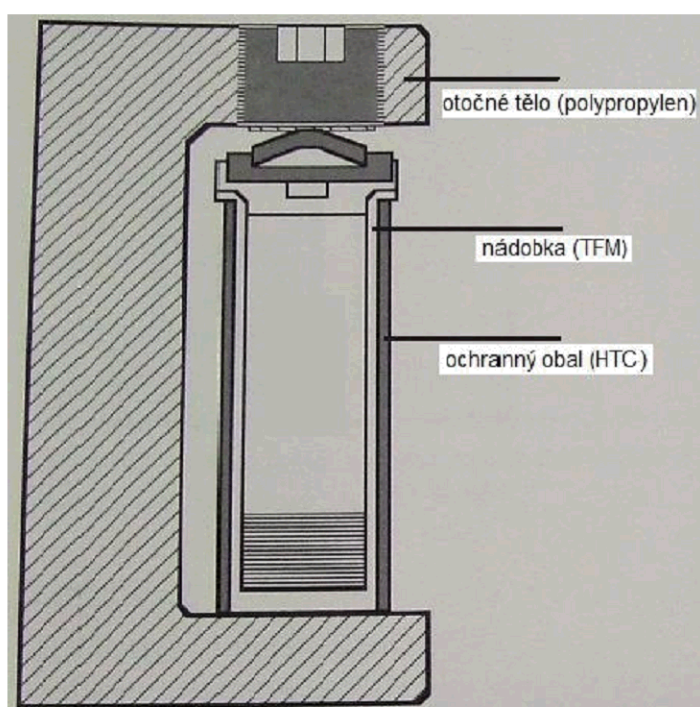
Veškeré použité přístroje a vybavení jsou uvedeny spolu s výrobcí v tabulce 2.

Tab.2: Použité přístroje a jejich výrobci.

přístroj	výrobce
mikrovlnný laboratorní systém	MILESTONE, MLS-1200
AAS ZEE nit 60	Analytik Jena AG, Německo
AAS SpectraAA 30	Varian, USA
sušárna model 500	Memmert, Německo
ultrazvuková lázeň	Notus-Powersonic s r. o. Vráble, SR
Elektronické analytické váhy	Denver Instruments, Německo
mikropipety	BIOHIT, Helsinky, Finsko
třepačka IKA	Helago, ČR
pH metr WTW 320	Weilheim, Německo

### 3.2.1 Mikrovlnný laboratorní systém Milestone, MLS-1200 MEGA

Mikrovlnný rozkládací systém (MDS) s MDR technologií byl navrhnut pro kompletní, bezpečný a spolehlivý rozklad vzorků pro měření metodami AAS, ICP-OES a ICP-MS. Tento systém byl speciálně navrhnut pro laboratorní použití a tím pádem dobře snáší těžší laboratorní podmínky a opakované vystavování agresivní kyselině a organickým rozpouštědlům, které se běžně používají při procesech přípravy vzorků. Vysoká odolnost materiálu použitého na nádobky a ochranný obal (TFM+HTC) dovoluje dosažení velmi vysokých teplot a tím pádem i kompletní rozklad vzorku. Maximální pracovní teplota je 270 °C [39].



Obr. 7: Náčrt nádoby připravené pro mikrovlnný rozklad. Převzato z [39].

Mikrovlnný laboratorní systém byl použit pro rozklad vzorků mechu pro stanovení celkové koncentrace kadmia (vzorky mechu z modelového a reálného systému). Bylo použito tlakového mikrovlnného rozkladu (program 11) v TFM nádobkách za přítomnosti kyseliny dusičné a peroxidu vodíku. Rozklad probíhal v pěti krocích při následujícím nastavení přístroje.

Tab.3: Nastavení mikrovlnného rozkladu v programu 11.

Mikrovlnný rozklad – program 11		
	výkon (W)	čas (min)
<b>1.krok</b>	250	1
<b>2.krok</b>	0	2
<b>3.krok</b>	250	5
<b>4.krok</b>	400	5
<b>5.krok</b>	300	3
<b>ventilace</b>	-	1
<b>chlazení</b>	-	10



Obr.8: Mikrovlnný laboratorní systém Milestone, MLS-1200 MEGA.

### 3.2.2 AAS s atomizací v plameni

Atomový absorpční spektrometr s atomizací v plameni firmy Varian, model Varian SpectraAA 30 používá jako zdroj primárního záření výbojku s dutou katodou a je vybaven deuteriovou výbojkou pro automatickou korekci pozadí. K atomizaci vzorku kovu se používá plamen acetylen-vzduch.

Na tomto přístroji byla prováděna analýza celkové koncentrace kadmia ve vodním mechu *Fontinalis antipyretica* a ve vzorcích vody, v níž byly očekávány vyšší koncentrace kovu.



Tab.4: Nastavení parametrů pro analýzu kadmia.

Kadmium	
vlnová délka (nm)	228,8
šířka štěrby (nm)	0,8
výška hořáku (mm)	13,5
proud výbojky s dutou katodou (mA)	6
průtok acetylenu (ml·min <sup>-1</sup> )	1,5
průtok vzduchu (ml·min <sup>-1</sup> )	3,5
čas měření (s)	10



Obr.9: AAS s atomizací v plameni, Varian SpectraAA 30

### 3.2.3 AAS s elektrotermickou atomizací

Atomový absorpční spektrometr AAS ZEEnit 60 firmy Analytik Jena AG se začleněným elektrotermickým atomizátorem využívá korekci pozadí na základě Zeemanova jevu a automatický dávkovač MPE60. K ovládání spektrometru se používá počítačový software WinAAS verze 3.15.0.

Na tomto přístroji byla prováděna analýza celkové koncentrace kadmia ve vodním mechu *Fontinalis antipyretica* a ve vzorcích vody, v níž byly očekávány nižší koncentrace kovu.

Tab.5: Nastavení parametrů pro analýzu kadmia.

<b>Kadmium</b>			
spektrometr			
<b>vlnová délka (nm)</b>	228,8	<b>šířka štěrbin (nm)</b>	0,5
<b>typ lampy</b>	HCL	<b>proud výbojky (mA)</b>	6
teplotní program			
	<b>teplota</b>	<b>čas</b>	
<b>sušení</b>	80	22	
<b>sušení</b>	90	22	
<b>sušení</b>	105	25	
<b>sušení</b>	110	12,5	
<b>rozklad</b>	600	12	
<b>atomizace</b>	1000	3,3	
<b>čištění</b>	2200	6,4	



Obr.10: AAS s elektrotermickou atomizací, AAS ZEE nit 60.



### 3.3 Pracovní postupy

#### 3.3.1 Modelový systém

##### 3.3.1.1 Odběr vzorku mechu

Mech *Fontinalis antipyretica* byl získán z lokality u obce Hynkov, vzdálené přibližně 15 km od města Olomouc. Mech byl odebrán z Mlýnského potoka, který se jako levostranný přítok vlévá do řeky Moravy ve výšce asi 600 m n. m. a jeho délka je asi 4,6 km. (Obr. 11). Jedná se o středně rychle tekoucí říčku, nepřiliš hlubokou a s bahnitým dnem. Vyskytují se zde bohaté nárosty vodního mechu *Fontinalis antipyretica*, které jsou přichyceny zejména na větších kamenech, které pokrývají koryto říčky.

Po odebrání byly trsy mechu několikrát přečištěny vodou, za účelem odstranění hrubých nečistot a přichycené epifauny. Vzorky byly umístěny do čistých polyethylenových nádob a spolu s říční vodou transportovány do laboratoře k dalšímu zpracování.



Obr.11: Mapa oblasti vzorkování s červeně vyznačenou lokalitou odběru.

### **3.3.1.2 Ultrasonické čištění kombinované s ošetřením jódem**

K odstranění epifytických mikroorganismů (řasy a zooplankton) ze vzorků mechu byla použita adaptace metody Chen (1998) [19]. Mech byl umístěn do nádoby obsahující kultivační médium s 1% roztokem KI-I<sub>2</sub> (0,66% KI a 0,33% I<sub>2</sub> rozpuštěné v destilované vodě) a podroben ultrasonickému čištění po dobu 3 minuty.

### **3.3.1.3 Kultivace mechu v laboratoři**

Po ultrasonickém čištění byly vzorky mechu znovu několikrát proprány destilovanou vodou a umístěny do kultivačního média, které bylo modifikováno na základě Knopova média. Složení kultivačního média bylo následující KNO<sub>3</sub> (25 mg·l<sup>-1</sup>), NaNO<sub>3</sub>·2H<sub>2</sub>O (100 mg·l<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (25 mg·l<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (25 mg·l<sup>-1</sup>) a NaHCO<sub>3</sub> (10 mg·l<sup>-1</sup>), jedná se o konečnou koncentraci bez přidání kovů [18].

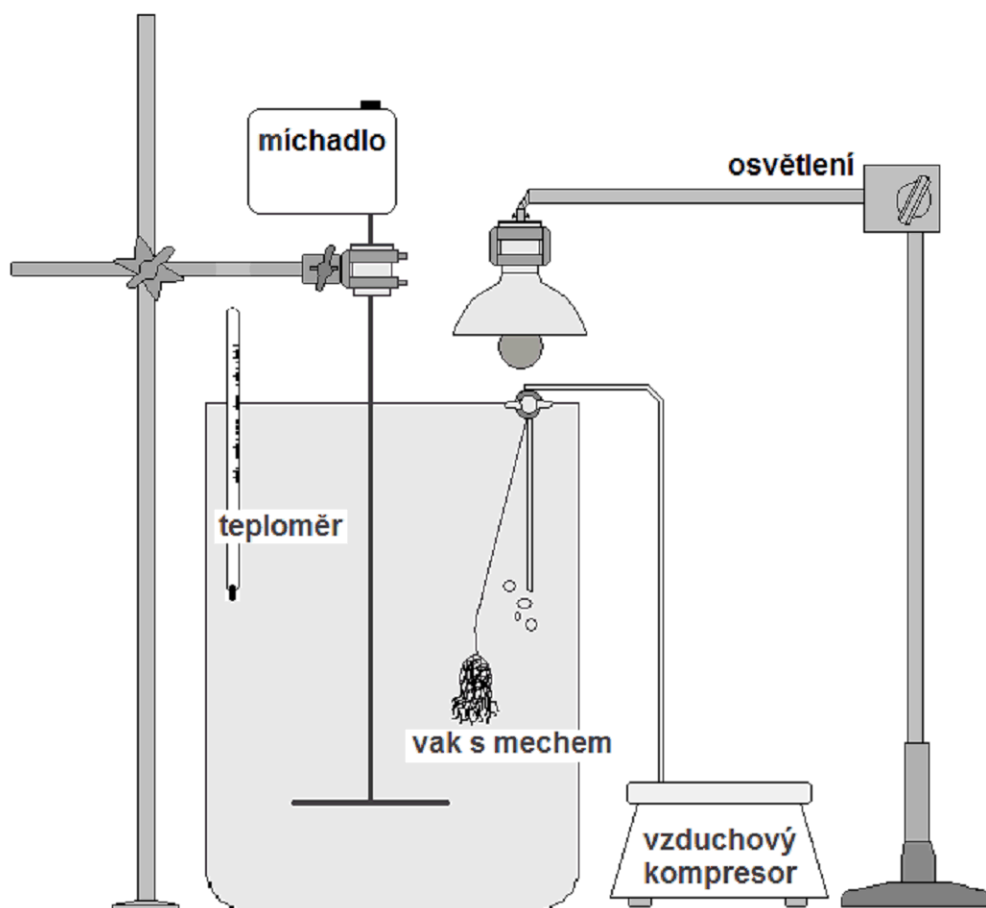
### **3.3.1.4 Studium akumulace a detoxikace kadmia mechem *Fontinalis antipyretica***

Pro účel pokusu byl vzorek mechu v plastové mřížce zavěšen do barelu s 50 litry kultivačního média a s přidanou koncentrací kadmia (100 µg·l<sup>-1</sup>) po dobu tří dnů (akumulační doba). Koncentrace kadmia v roztoku byla pravidelně dvakrát denně měřena a doplňována na počáteční hodnotu za účelem udržení stálých podmínek experimentu. Po třech dnech byla ukončena akumulační doba a vzorek mechu byl přemístěn do barelu s 50 litry kultivačního média, bez přidání kovu, k detoxikaci po dobu dalších třech dnů. Každý den experimentu byl odebrán vzorek části mechu k dalšímu zpracování.

Po celou dobu pokusu (akumulační i detoxikační doba) bylo médium se vzorkem mechu mícháno s pomocí časovače v intervalu 10 minut každé 4 hodiny. Součástí pokusné aparatury bylo i umělé osvětlení, vzduchový kompresor zajišťující neustálý přívod kyslíku a teploměr. (Obr. 12).

### **3.3.1.5 Úprava vzorku mechu pro stanovení intra a extracelulární frakce kovů**

Části vzorků mechu, pravidelně odebírané v průběhu experimentu, byly propláchnuty destilovanou vodou a sušeny při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. K dalšímu zpracování byly z usušeného mechu odtrhány pouze lístečky. Na analytických vahách bylo naváženo vždy přibližně 50 mg upraveného mechu. Navážky byly převedeny do plastových lahvíček, do kterých bylo přidáno 10 ml chloridu nikelnatého. Lahvičky byly uzavřeny a třepány na třepačce po dobu 90 minut. Po ukončení procesu byly vzorky přefiltrovány přes membránové filtry o velikosti pórů 0,45 µm. Takto připravené vzorky byly následně analyzovány.



Obr. 12: Schéma zařízení pro studium akumulace a detoxikace kadmia mechem *Fontinalis antipyretica*.

### 3.3.1.6 Úprava vzorku mechu pro stanovení celkové koncentrace kovů

Části vzorků mechu, pravidelně odebírané v průběhu experimentu, byly propláchnuty destilovanou vodou a sušeny v horkovzdušné sušárně při teplotě 60°C po dobu 24 hodin. Takto usušené vzorky byly v porcelánové třecí misce zhomogenizovány na co nejmenší části. Na analytických vahách bylo naváženo vždy přibližně 100 mg upraveného mechu. Navážky byly převedeny do TFM nádobek, do kterých bylo přidáno 5 ml 65%  $\text{HNO}_3$  a 2 ml 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nádobky byly uzavřeny a vloženy do mikrovlnného zařízení Milestone k rozkladu, podle předem zvoleného programu (kapitola 3.2.1). Po ukončení programu byly rozložené vzorky kvantitativně převedeny do odměrných baněk o objemu 25 ml a doplněny ultračistou vodou. Jako materiál kontroly kvality (CRM) byla použita zelená řasa (Metranal-8, Analytika, Nymburk, ČR). Takto připravené vzorky mechu byly následně analyzovány.

### 3.3.1.7 Analýza upravených vzorků mechu a vody

Vzorky vody odebírané průběžně během celého experimentu a upravené vzorky mechu z extrakce chloridem nikelnatým byly analyzovány na AAS s elektrotermickou atomizací při podmínkách uvedených v kapitole 4.2.3. Dávkováno bylo 20  $\mu\text{l}$  vzorku a měření bylo vždy třikrát opakováno. Výsledky byly vyhodnoceny metodou kalibrační křivky v rozmezí koncentrací 0-30  $\mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$ , ředění vycházelo z připraveného kalibračního roztoku o koncentraci 5  $\mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$ . Upravené vzorky mechu z mikrovlnného rozkladu byly analyzovány na AAS s atomizací v plameni při podmínkách uvedených v kapitole 4.2.2. Výsledky byly vyhodnoceny metodou kalibrační křivky při použití roztoků o koncentracích 0; 0,5; 1 a 1,5  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

### 3.3.2 Expozice v reálném systému

Vzhledem k tomu, že laboratorní podmínky jsou zcela odlišné od podmínek reálného systému, slouží nám spíše k přiblížení možných přírodních situací. Experimenty v modelových systémech jsou proto pouze cenným základem pro experimenty prováděné v reálných systémech.

#### 3.3.2.1 Příprava jednotek DGT a moss-bagů

Mech *Fontinalis antipyretica* odebraný z lokality u obce Hynkov byl v laboratoři 24 hodin kultivován, poté propláchnut destilovanou vodou a upraven do formy tzv. moss-bagů, vhodných pro expozici v reálném systému. Moss-bag je tvořen perforovanou plastovou mřížkou, do které se uzavře vzorek mechu. Vak s mechem se zatíží, aby bylo zabráněno jeho vyplavání na hladinu během doby experimentu.

Do jednotek DGT byly vloženy gely připravené v laboratoři podle postupu uvedeného v [41]. Poté byly 4 jednotky DGT svázané pomocí silikonového lanka, opatřeny opět závažím a připraveny tak pro expozici v reálném systému (Obr. 13).



Obr. 13: Jednotky DGT a moss-bagy připravené pro expozici.

### 3.3.2.2 Expozice jednotek DGT a moss-bagů v reálném systému

Připravené jednotky DGT a moss-bagy byly společně aplikovány v reálném systému na třech vybraných lokalitách na středním toku řeky Moravy. Tyto lokality, Bělov, Spytihněv a Uherské Hradiště, jsou od sebe vzdáleny přibližně 10 km po proudu řeky (Obr. 14).

Jednotky DGT a moss-bagy byly uchyceny pomocí silikonového lanka na speciální nosné zařízení, které bylo umístěno do proudu řeky. Nosné zařízení bylo vyrobeno z plastového koše, speciálními kovovými úchyty připevněno k pneumatice a zalito betonem, aby bylo zabráněno odnesení zařízení proudem řeky.



Obr.14: Mapa s červeně vyznačenými lokalitami vybranými pro expozici.



### ***3.3.2.3 Úprava a analýza jednotek DGT a moss-bagů po expozici***

Doba expozice činila 28 dní. Po uplynutí této doby, byly jednotky DGT vyjmuty a rozebrány. Exponované gely byly přeneseny do polyethylenových vialek a po přidání 1 ml 1M kyseliny dusičné eluovány po dobu 24 hodin . Takto připravené eluáty byly následně analyzovány.

Exponované mechy byly po vyjmutí z řeky několikrát promyty v říční vodě a propláchnuty destilovanou vodou. Vzorky byly transportovány do laboratoře, kde byly ihned přemístěny do horkovzdušné sušárny a sušeny po dobu 24 hodin při teplotě 60°C. Dále byly vzorky mechu upraveny podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.1.6 a analyzovány podle postupu v kapitole 3.3.1.7.

Ve všech lokalitách byly rovněž odebrány vzorky vody a to vždy dva o objemu 10 ml, jeden nefiltrovaný a jeden filtrovaný (přes membránový filtr s velikostí pórů 0,45 µm). Odebrané vzorky byly na místě okyseleny 400 µl 1M kyseliny dusičné. Vzorky vody byly odebrány pro stanovení celkové a celkové rozpuštěné koncentrace kadmia. Analyzovány byly pomocí AAS s elektrotermickou atomizací podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.1.7.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Obsah kadmia v mechorostu *Fontinalis antipyretica*

Obsah kadmia v mechorostu *Fontinalis antipyretica*, odebraného z lokality Hynkov, byl stanoven přímo v neupraveném vzorku, který byl pouze na místě propláchnut říční vodou a v laboratoři destilovanou vodou a ve vzorku ošetřeném ultrazvukem a jodidem draselným. V neupraveném vzorku byla stanovena průměrná koncentrace kadmia  $35 \pm 15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , v upraveném vzorku  $23 \pm 6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Tyto koncentrace přibližně odpovídají přirozenému pozadí kadmia v mechorostu *Fontinalis antipyretica* z jiných středních toků Evropy [3, 30, 42]. Výsledky rovněž potvrdily, že pouhé propláchnutí vzorku vodou nemusí stačit k odstranění částic a mikrofauny ulpěné na povrchu mechorostu. Čištění vzorku pomocí ultrazvuku a jodidu draselného je šetrné k samotné rostlině a dokáže efektivně odstranit zbylé částice a mikroorganismy ulpěné na povrchu mechu. Dokonalé odstranění všech částic a mikroorganismů z povrchu mechu je nezbytně důležité zejména pro experimenty prováděné v laboratorním měřítku. Předchází se tak zbytečnému zkreslení výsledků měření při akumulčních a detoxikačních experimentech.

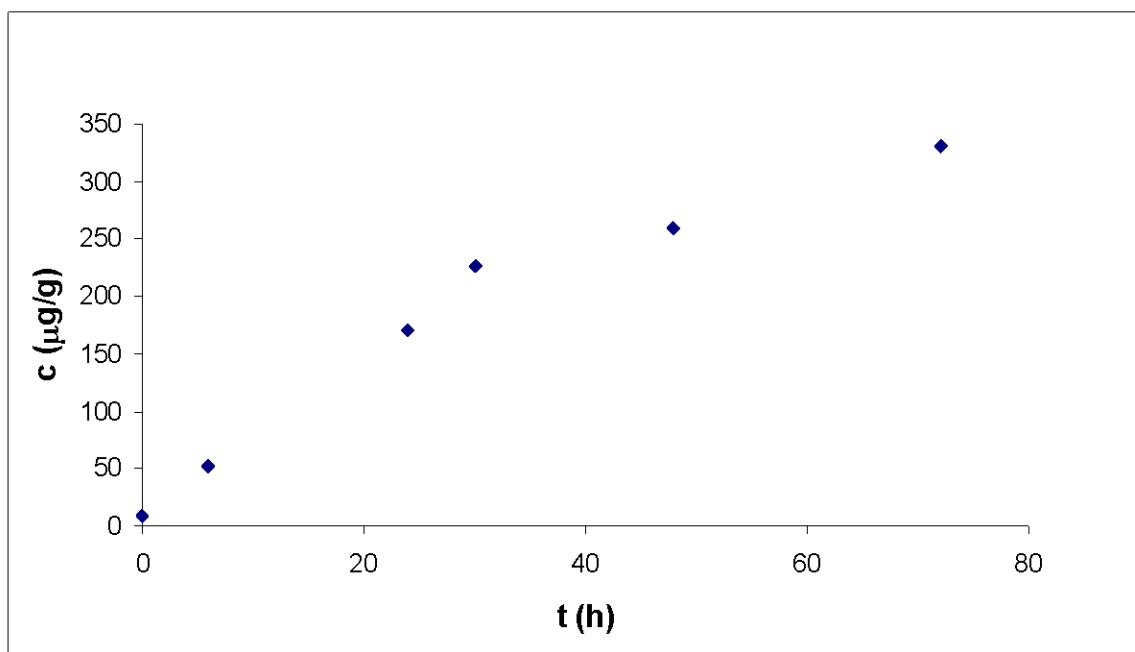
### 4.2 Experimenty v modelovém systému

V počáteční fázi testování bioakumulace kadmia vodním mechorostem *Fontinalis antipyretica* byly šestidenní experimenty prováděny v nádobách o objemu přibližně 10 litrů, což se po prvních dnech prokázalo za nevyhovující, neboť koncentrace kadmia klesla z počáteční hodnoty  $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  během několika hodin na téměř nulovou hodnotu. Byl proveden slepý pokus pouze s roztokem kadmia, čímž došlo k vyloučení možnosti sorbování kadmia na stěny nádoby a potvrzení předpokladu, že kadmium se v takto malém objemu bez pravidelného míchání velice snadno sorbuje na povrchu mechu. Bylo tedy nutno jednak zajistit dostatečně velký objem roztoku a jeho pravidelné míchání a jednak vhodné uložení mechu v nádobě, neboť bylo potřeba docílit, aby mech v perforovaném vaku nesedl na dno či neplaval na hladině. K dalšímu testování byla proto použita plastová nádoba o objemu 60 litrů a provizorní míchací zařízení.

V dalších fázích testování byly stanovovány vhodné koncentrace kadmia pro průběh experimentu. Koncentrace kadmia nižší než  $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  nebyly testovány z důvodu velmi rychlých změn koncentrací kadmia v roztoku a nutnosti častého doplňování koncentrace na původní hodnotu. Tento problém by mohl být vyřešen kontinuálním uspořádáním experimentu, za použití zásobního roztoku, odpadní láhve a peristaltických pump. Během diplomové práce však toto uspořádání nebylo možné zrealizovat. Koncentrace kadmia 50 a  $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  byly pro průběh experimentu stanoveny jako nejvíce vyhovující, neboť již při koncentracích vyšších ( $200 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $300 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a třídní expozici začal mech postupně odumírat, což se projevovalo zežloutnutím až zhnědnutím lístků. Vyšší koncentrace kadmia nebyly dále testovány z důvodu toxických vlastností kadmia.

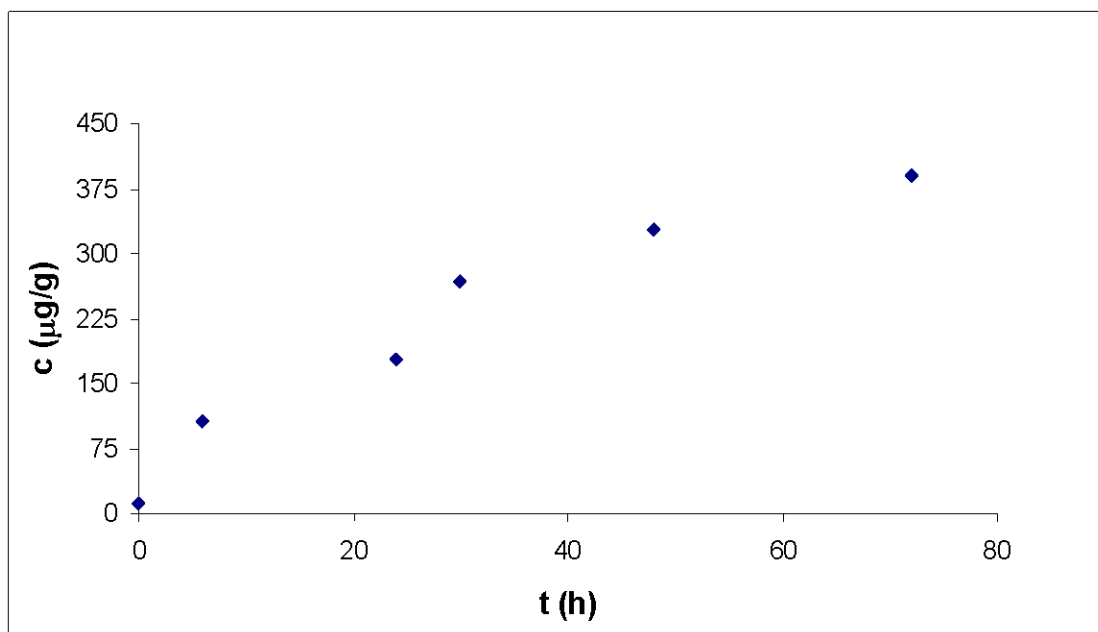
#### 4.2.1 Akumulační experiment

V laboratorním měřítku byla zkoumána schopnost akumulace a detoxikace kadmia vodním mechorostem *Fontinalis antipyretica*. Přibližně 20 gramů mechu bylo umístěno do perforovaného vaku a tento pak byl ponořen do kultivačního roztoku s přidanou koncentrací kadmia. Roztok byl probubláván vzduchem a občasně míchán. Po celou dobu experimentu byla měřena teplota, která se pohybovala kolem 20°C. K zajištění životních podmínek byla v experimentu použita také UV lampa, která simulovala sluneční svit v režimu 8/16 (8 hodin světlo/16 hodin tma). V předem zvolených intervalech pak byly části mechu z roztoku odebírány a analyzovány na obsah kadmia, poslední část byly odebrána po 72 hodinách (3dny) akumulace. Experiment byl prováděn v roztoku kadmia o koncentraci 50 a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Z provedených experimentů byla vypočtena konstanta akumulace kadmia mechorostem *Fontinalis antipyretica*  $10,8 \pm 0,5 \text{ den}^{-1}$ . Tato konstanta je velmi blízká hodnotě konstanty stanovené při experimentech s mechorostem *Fontinalis dalecarlica* [42].



Obr.15: Grafické znázornění experimentu akumulace kadmia mechorostem *Fontinalis antipyretica* v roztoku  $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .





Obr.16: Grafické znázornění experimentu akumulace kadmia mechorostem *Fontinalis antipyretica* v roztoku  $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

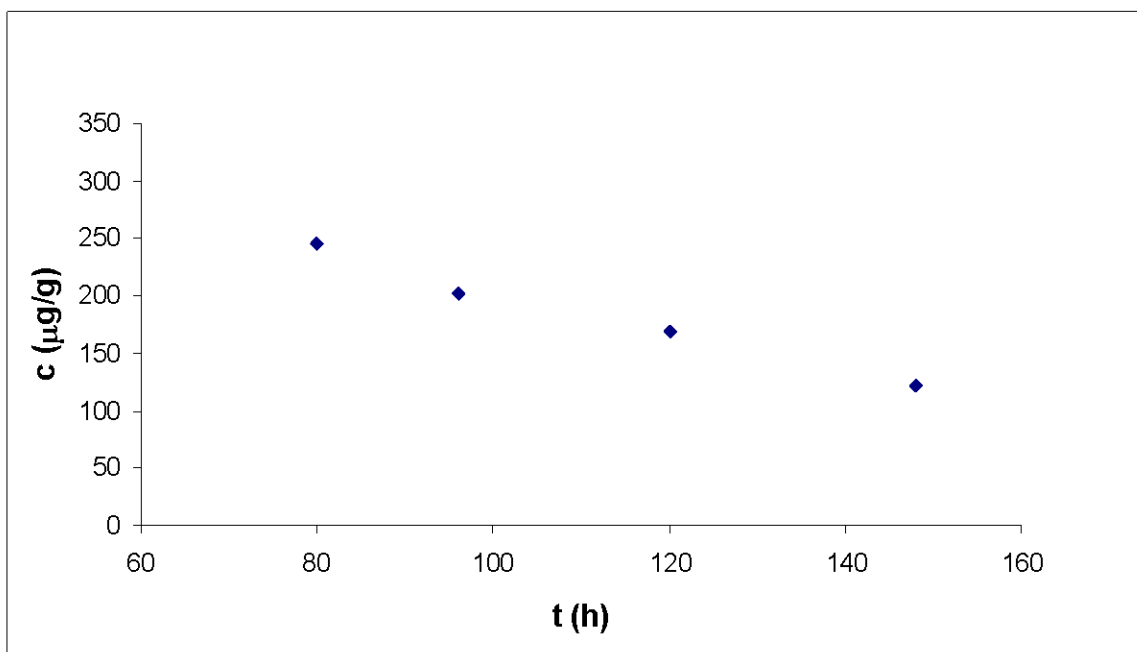
#### 4.2.2 Detoxikační experiment

Po třídní akumulaci fázi následovala stejně dlouhá fáze detoxikační. Uspořádání experimentu bylo stejné jako v předchozím případě, s tím rozdílem, že vzorek mechu v perforovaném vaku byl přemístěn do čistého kultivačního média bez přídavku kadmia.

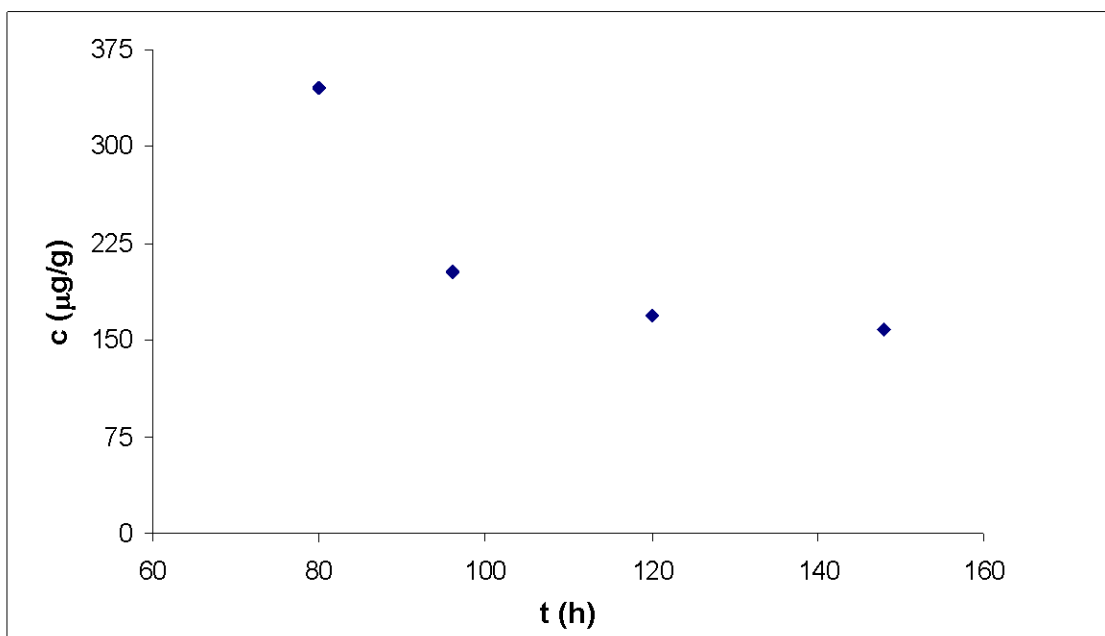
Z provedených experimentů byla vypočtena detoxikační konstanta kadmia mechorostem *Fontinalis antipyretica*  $0,28 \pm 0,04 \text{ den}^{-1}$ . Tato konstanta je rovněž velmi blízká hodnotě stanovené při experimentech s mechorostem *Fontinalis dalecarlica* [42].

#### 4.2.3 Stanovení intra a extracelulární koncentrace kadmia

Pro lepší pochopení procesu akumulace a detoxikace kadmia mechorostem *Fontinalis antipyretica* byla během akumulacího a detoxikačního experimentu sledována intra a extracelulární koncentrace kadmia, za použití specifických extrakčních činidel. Bohužel, takto získané výsledky byly těžko vyhodnotitelné, především díky vysokým koncentracím kadmia ve slepých roztocích extračních činidel. Použité chemikálie byly sice čistoty p.a., avšak byly nejméně 20 let staré a nebyla známa jejich historie. Náhradní chemikálie nebyly k dispozici. Pro provedení experimentů je tak třeba pracovat s chemikáliemi vyšší čistoty, nebo s chemikáliemi čistoty p.a., ale novými.



Obr.17: Grafické znázornění detoxikačního experimentu v roztoku kadmia o koncentraci  $50 \mu\text{g} \cdot \text{t}^{-1}$ .



Obr.18: Grafické znázornění detoxikačního experimentu v roztoku kadmia o koncentraci  $100 \mu\text{g} \cdot \text{t}^{-1}$ .

### 4.3 Reálný systém

Mech *Fontinalis antipyretica* byl po uplynutí laboratorních experimentů aplikován do reálného prostředí řeky Moravy za účelem stanovení průměrné (bio)dostupné frakce kadmia. Koncentrace (bio)dostupné frakce kadmia byla následně porovnávána s koncentracemi zjištěnými technikou DGT a běžnou analýzou filtrovaného a nefiltrovaného vzorku vody. Za expoziční dobu byl zvolen standardní a ověřený interval 28 dní. Výsledky experimentu prováděného na třech lokalitách řeky Moravy (Bělov, Spytihněv, Uherské Hradiště) jsou znázorněny v Tab. 6.

Tab 6: Výsledky experimentu na řece Moravě (koncentrace v  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

lokalita	(bio)dostupná koncentrace	DGT stanovená koncentrace	celková rozpuštěná koncentrace	celková koncentrace
Bělov	0,032	0,00018	méně než 0,07	0,15
Spytihněv	0,038	0,00035	méně než 0,07	0,11
Uh. Hradiště	0,037	0,00015	0,1	0,8

Koncentrace stanovená technikou DGT byla o dva řády nižší než koncentrace vypočtená z množství kadmia akumulovaného mechorostem *Fontinalis antipyretica*. (Bio)dostupná koncentrace kadmia se více blížila celkové rozpuštěné koncentraci kadmia. Tento výsledek neodpovídá závěrům podobné studie, prováděné na řece Svitavě, kde byla nalezena přesně opačná závislost. Podobné závislosti však byly pozorovány u mědi. Technika DGT měří pouze kineticky labilní formy kovů, které jsou schopny difúze přes difúzní gel a vazby na sorpční gel. Jestliže vezmeme v úvahu, že při experimentu na řece Moravě byl použit difúzní gel o tloušťce 0,8 mm, pak DGT koncentrace kadmia reflektuje koncentraci hydratovaných iontů kadmia a koncentraci kadmia vázaného v komplexech schopných disociace během 2 minut. Naproti tomu, difúze kadmia biologickou membránou je daleko složitější proces a čas pro disociaci komplexů s kadmiem tak může být podstatně delší. Z tohoto důvodu může být vypočtená (bio)dostupná koncentrace kadmia větší než koncentrace naměřená technikou DGT. I přesto, že je třeba dbát opatrnosti při formulování závěrů z tohoto experimentu z důvodů jeho krátkodobého trvání a možné statistické chyby, dosažené výsledky napovídají, že je třeba věnovat více pozornosti vzájemnému porovnávání technik a hledání vztahu mezi reálnou koncentrací kovů ve vodě a (bio)dostupnou koncentrací.

## 5. ZÁVĚR

Tato práce se zabývala studiem procesů akumulace a detoxikace kadmia mechorostem *Fontinalis antipyretica*. V laboratorních podmínkách, v roztocích obsahující čisté kultivační médium s koncentrací kadmia 50 a 100  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , byla stanovena hodnota akumulační konstanty  $10,8 \pm 0,5 \text{ den}^{-1}$  a hodnota detoxikační konstanty  $0,28 \pm 0,04 \text{ den}^{-1}$ . Zjištěné hodnoty korespondují s hodnotami akumulačních a detoxikačních konstant zjištěných u mechorostu *Fontinalis dalecarlica*.

Pokus zabývající se bližším pochopením procesu akumulace a detoxikace formou stanovení intra a extracelulární koncentrace nebyl bohužel úspěšný. Problémy při interpretaci naměřených výsledků činily vysoké hodnoty blanků extrakčních činidel. Pro další studie je nutné použít pouze ověřené chemikálie nebo chemikálie čistoty vyšší než p.a.

Mechorost *Fontinalis antipyretica* byl použit ke stanovení (bio)dostupné koncentrace kadmia na vybraných místech řeky Moravy. Zjištěná (bio)dostupná koncentrace byla porovnávána s koncentracemi kadmia naměřených po standardních odběrech vzorků filtrované a nefiltrované vody a s koncentrací naměřenou technikou difúzního gradientu v tenkém filmu. Na rozdíl od výsledků z podobné studie prováděné na řece Svitavě, nebyl nalezen vztah mezi (bio)dostupnou koncentrací kadmia a DGT koncentrací. Obsah (bio)dostupných forem kadmia koreloval více s celkovou rozpuštěnou frakcí kadmia, což napovídá o rozdílné akumulaci různých forem kadmia v říční vodě.

Přestože technika DGT je v současnosti nejvíce slibnou technikou pro stanovení (bio)dostupných forem kovů v přírodních vodách, jen těžko může plně napodobit složité procesy probíhající v buněčných membránách a je tak stále nutné věnovat pozornost tomu, jaké formy kovů technika DGT měří a jak přesně probíhá akumulace kovů ve vodních organismech v závislosti na chemickém složení vody a stále se měnících přírodních podmínkách.

## 6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Bencko, V., Cikrt, M., Lener, J.: *Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, spol. s r. o., 1995. 288s. ISBN 80-7169-150-X.
- [2] Popl, M., Fährnich, J.: *Analytická chemie životního prostředí*. 2.vyd. Praha: Ediční a audiovizuální centrum VŠCHT, 1995. 262s. ISBN 80-7080-165-4.
- [3] Vazquez, M. D., Wappelhorst, O., Markert, B.: *Water, Air and Soil Pollution*, 2004, vol.152, pp. 153-172.
- [4] Rainbow, S.: *Marine Pollution Bulletin*, 1995, vol. 31, pp. 183-186.
- [5] Svobodová, Z., Máchová, J., Vykusová, B., Piačka, V.: *Kovy v ekosystémech povrchových vod*. 1.vyd. Vodňany: Edice Metodik, 1996. 20s. ISBN 80-85887-06-1.
- [6] Pitter, P.: *Hydrochemie*. 3.přepřacované vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 1999, 340s. ISBN 80-7080-340-1.
- [7] Cibulka, J. a kol.: *Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosféře*. 1. vyd. Praha: Academia-nakladatelství Československé akademie věd ve spolupráci s ministerstvem životního prostředí České republiky, 1991. 432s. ISBN 80-200-0401-7.
- [8] Cibulka, J. a kol.: *Pohyb olova, kadmia a rtuti v zemědělské výrobě a biosféře*. 2. vyd. Praha: Ministerstvo zemědělství a výživy ČSR ve Státním zemědělském nakladatelství, 1986. 160s.
- [9] Dočekal, B., et al. *Atomová absorpční spektrometrie: Sborník přednášek*. 2. upr. vyd. Český Těšín : Ing. Václav Helán, 2003. 164 s. ISBN 80-86380-16-5.
- [10] Černohorský, T., Jandera, P.: *Atomová spektroskopie*. Pardubice : Univerzita Pardubice, 1997. 218 s. ISBN 80-7194-114-X.
- [11] Diviš, P.: *Vývoj in situ gelových technik pro měření biodostupnosti forem kovů ve vodných systémech*, Brno, 2006. Disertační práce na Chemické fakultě Vysokého učení technického, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Vedoucí disertační práce Prof. RNDr. Hana Dočekalová, CSc.
- [12] Zhang, H., Davison, W.: *Analytical Chemistry*, 1995, vol. 67, pp. 3391-3400.
- [13] Zhang, H., Davison, W.: *Analytica Chimica*, 1999, vol. 398, pp. 329-335.
- [14] Gimpel, J., Zhang, H., Davison, W., Edwards, C.A.: *Environmental Science Technology*, 2003, vol. 37, pp. 138-142.
- [15] Diviš P., Dočekalová H., Smetková V.: *Chemické Listy*, 2005, roč. 99, s. 640-646.
- [16] Zhang, H., Davison, W.: *In situ monitoring of aquatic systems*. Jacques Buffle. Hardcover, 2000. 642 s. ISBN 978-0-471-48979-5.
- [17] DGT Research Ltd., Lancaster, UK: *DGT for measurement in waters, soils and sediments*. [cit. 2008-04-23]. Dostupné z: <<http://www.dgtresearch.com>> [Download Technical pdf document].
- [18] Unsworth, E.R., Zhang H., Davison W.: *Environmental Science Technology*, 2005, vol. 39, pp. 624.
- [19] Scally. S., Davison W., Zhang H., *Environmental Science Technology*, 2003, vol. 37, pp. 1379.
- [20] Twist, M.R., Moffett J.W., *Environmental Science Technology*, 2002, vol. 36, pp. 1061.

- [21] Olivová, P.: *Bioakumulace perzistentních organických polutantů v biomase vodního květu sinic*, Brno, 2007, Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity. Vedoucí diplomové práce RNDr. Jana Klánová Ph.D.
- [22] John, D.A., Leventhal, J.S.: *Bioavailability of metals*, 2005.
- [23] Luoma, S.N.: *Hydrobiologia*, 1989, vol.176/177, pp.379-396.
- [24] Elder, J.F.: *Geological Survey Circular*, 1989, vol.1013, pp.43.
- [25] Salomons, W.: *Journal of Geochemical Exploration*, 1995, vol. 52, pp. 5-23.
- [26] Bourg, A.C.M.: *Chemistry and biology of solid waste*, 1988, Springer-Verlag, pp. 3- 32.
- [27] Luoma, S.N.: *The Science of the Total Environment*, 1983, vol.28, pp. 1-22.
- [28] <http://www.daphne.cz/indikacezivin/metodika.shtml>, datum poslední revize: 17. 4. 2008.
- [29] Siebert, A., Bruns, I., Krauss, G.-J., Miersch, J., Markert, B.: *The Science of the Total Environment*, 1996, vol. 177, pp. 137-144.
- [30] Samecka-Cymerman, A., Kempers, A.J.: *Environmental Geology*, 1999, vol. 39, pp. 117-127.
- [31] Martins, R.J.E., Pardo, R., Boaventura, R.A.R.: *Water Research*, 2004, vol. 38, pp. 693-699.
- [32] Martins, R.J.E., Boaventura, R.A.R.: *Water Research*, 2002, vol. 36, pp. 5005-5012
- [33] <http://www.ecy.wa.gov/programs/wq/plants/plantid2/descriptions/fofontal.html>, datum poslední revize: 12. 4. 2008.
- [34] <http://www.bio.umass.edu/biology/conn.river/fofontal.html>, datum poslední revize: 12. 4. 2008.
- [35] [http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Fontinalis\\_antipyretica.jpeg](http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Fontinalis_antipyretica.jpeg)-obrázek listku, datum poslední revize: 12. 4. 2008.
- [36] Webb, J.A., Keough, M.J.: *Marine Pollution Bulletin*, 2002, vol. 44, pp. 222-223.
- [37] Goncalves, E.P., Boaventura, R.A.R.: *Water Research*, 1998, vol.32, pp. 1305.
- [38] Martins, R.J.E., Boaventura, R.A.R.: *Water research*, 2002, vol. 36, pp. 5005-5012.
- [39] Milestone, MLS-1200 MEGA, Microwave Digestion System with MDR Technology, operator manual.
- [40] Rausch de Traubenberg, C., Ah-Peng, C.: *Environmental Contamination Toxikology*, 2004, vol. 46, pp. 289-295.
- [41] Brulík, L.: *Gelové techniky pro speciální analýzu toxikologicky významných prvků ve vodách*, Brno, 2006. Diplomová práce na Chemické fakultě Vysokého učení technického, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Vedoucí diplomové práce Prof. RNDr. Hana Dočekalová, CSc.
- [42] Croisetiere, L., Hare, L., Tessier, A., Duchesne, S.: *Environmental Science and Technology*, 2005, vol. 39, pp. 3056-3060.

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

### 7.1 Seznam použitých zkratk

AAS ETA	Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací Atomic Absorption Spectrometry with Electrotermic Atomization
AAS FA	Atomová absorpční spektrometrie s atomizací v plameni Atomic Absorption Spectrometry with Flame Atomization
ASV	Anodická rozpouštěcí voltametrie Anodic Stripping Voltametry
BCF	Biokoncentrační faktor Bioconcentration factor
BEF	Bioeliminační faktor Bioelimination factor
CRM	Certifikovaný materiál Certificate materiál
DBL	Difúzní hraniční vrstva Diffusive double layer
DGT	Technika difúzního gradientu v tenkém filmu Diffusive Gradient in Thin Films Technique
FIAM	Model aktivity volného iontu Free Ion Activity Model
ICP-MS	Hmotností spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
HCL	Katoda s dutou výbojkou Hollow cathode lamp
HTC	Vysokoteplotní kompozit High temperature composite

IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii International Union of Pure and Applied Chemistry
MDR	Mikrovlnný rozkládací rotor Microwave Digestion Rotor
MDS	Mikrovlnný rozkládací systém Microwave Digestion System
PVC	Polyvinylechlorid Polyvinyl chloride
U.S.EPA	Americká agentura pro ochranu životního prostředí United States Environmental Protection Agency
TFM	Teflonový materiál Teflon material



## 7.2 Seznam použitých symbolů

$A$	plocha exponované části gelu
$C'$	koncentrace chemických forem kovů na rozhraní sorpčního a difúzního gelu
$C_{DGT}$	koncentrace chemických forem kovů ve vnějším roztoku
$C_e$	koncentrace chemických forem kovů v eluátu
$C_m$	koncentrace kovu v mechu
$C_{m0}$	počáteční koncentrace kovu v mechu
$C_{me}$	koncentrace kovu v mechu za rovnovážného stavu
$C_{mu}$	koncentrace kovu na konci doby akumulace
$C_{mz}$	zbytková koncentrace kovu v mechu
$C_v$	koncentrace kovu ve vodě
$D$	difúzní koeficient
$\delta$	tloušťka difúzního rozhraní
$\Delta g$	tloušťka difúzní vrstvy
$F$	tok iontů kovů
$f_e$	faktor eluce kovů ze sorpčního gelu
$k_1$	akumulační konstanta
$k_2$	detoxikační konstanta
$M$	množství kineticky labilních forem kovů sorbovaných v sorpčním gelu
$\rho$	hustota vody
$t$	doba akumulace a detoxikace
$t_d$	čas na konci doby příjmu
$t_{DGT}$	doba expozice DGT jednotky
$V_g$	objem sorpčního gelu
$V_e$	objem roztoku $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ kyseliny dusičné

## 8. PŘÍLOHY

### 8.1 Lokalita odběru mechu



*Mlýnský potok u obce Hynkov, lokalita odběru vodního mechu *Fontinalis antipyretica*.*

### 8.2 Vzorkování na řece Moravě



*Moss-bagy a jednotky DGT připravené pro expozici.*





*Odběr exponovaných jednotek DGT a moss-bagů z řeky Moravy.*



*Jednotky DGT a moss-bagy po 28denní expozici v řece Moravě.*